



TESIS DOCTORAL

MODALIDAD DE COMPENDIO DE ARTÍCULOS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA
MICROBIOTA ASOCIADA A VIEIRA (*Pecten
maximus*) EN DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO INTENSIVO EN CRIADERO**

Memoria que presenta Ana López Diéguez para optar al Grado
de Doctor en Biología.

ANA LÓPEZ DIÉGUEZ

Programa de Doctorado en Avances en Biología Microbiana y
Parasitaria

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

CIBUS-FACULTAD DE BIOLOGÍA

Santiago de Compostela, 2017

Jesús López Romalde, Catedrático de Microbiología y **Sabela Balboa Méndez**, Investigadora posdoctoral I2C del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informan: que la presente Tesis Doctoral titulada: “**Estudio comparativo de la microbiota asociada a vieira (*Pecten maximus*) en diferentes sistemas de cultivo intensivo en criadero**”, que presenta **Ana López Diéguez** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología bajo su dirección, y considerando que se haya concluída, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 25 de Septiembre de 2017

Dr. Jesús L. Romalde

Dra. Sabela Balboa

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación, 245119 (REPROSEED) del Subprograma KBBE-2009-1-2-11 del 7º Programa Marco (FP7) de la Comisión Europea.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Diez años después de mi llegada al departamento, con una mudanza de laboratorio, cátedras, tesis y plazas, decenas de compañer@s nuev@s, congresos nacionales e internacionales, cenas de despedidas y de bienvenidas, muestreos, cenas de fin de curso y de inicio de curso, nuevos proyectos, cocidos del departamento y una hija... aquí llega al fin la tesis. Viéndolo así, no me extraña que tardase tanto...Y en todo este proceso, siempre hubo gente que estuvo, como en los mejores matrimonios, para lo bueno y para lo malo a la que tengo que agradecer haber pasado conmigo por esta etapa.

En primer lugar a mi director y amigo Jesús L. Romalde, gracias por haberme dado la oportunidad de vivir todo esto, de otro modo no habría tenido el valor de intentarlo. Gracias por llevarme a Brasil y a Florida, por obligarme a superar o más bien, enfrentarme una y otra vez a mis miedos (aunque nunca se me va a quitar el pánico escénico...), por abrirme los ojos en mis múltiples cabezonerías, por enseñarme a tener recursos para buscar la solución y ser independiente la mayoría de las veces y por estar ahí cuando se me acaban los recursos. Gracias.

A la Dra. Toranzo, Alicia, gracias por acogerme en el departamento e incluirme desde el primer momento en el laboratorio. Para mi eres una referencia, ojalá llegase a tener un mínimo de tu tesón y tu capacidad de aprender. Ha sido un auténtico orgullo trabajar a tu lado estos años.

A Juan, qué decir... Arreglas y “desarreglas”, “canibalizas” (los del servicio técnico deberían meterte en nómina), y siembras el caos

allá por donde pasas llegando a desesperarnos más de una vez. Pero, eres la curiosidad hecha persona, me enseñaste millones de cosas de bacterias, bateas y baterías, de barcos y submarinos... ¡hasta me metiste en una piscina con un tiburón!!!! Esta película no habría sido ni la mitad de divertida si no hubieses estado en ella. Gracias por tener siempre un hueco para mí, para mis preguntas, para alegrarme un ratito con tu conversación, por los recortes de periódico del año 93 con una noticia curiosa que me hacen sonreír cuando llego y los encuentro encima de mi mesa. Por acogerme tan cariñosamente, muchas gracias.

A Bea, gracias por tu sensibilidad y cercanía. Por dejarme formar parte de tu equipo. Por ofrecerme una sonrisa y una mano amiga siempre. Por las conversaciones en las que arreglamos el mundo, gracias. (Aún nos debes esos vinos...)

A Celsa, gracias por hacernos la vida más fácil a todos a pesar de que muchas veces no te las demos. ¡Cómo haríamos sin ti...! Gracias por venir a avisar de todos los papeleos que tenemos que hacer, la matrícula, los plazos, las inscripciones a congresos, fechas de renovación, tienes que ir a firmar, este producto está descatalogado, tienes que pedir los días de vacaciones....y siempre con buen humor y buena cara. Gracias por cuidarme y tener siempre un ratito para una charla amable (¡sobre todo si es de Ourense!).

A Berta, parte de este trabajo es tuyo. Gracias por las toneladas de medios que hiciste para mí, muchas veces sin tener que pedírtelos, y siempre tan rápido y tan dispuesta. Créeme cuando te digo que habría tardado mil años en hacer este trabajo sin tu ayuda. Pero sobre todo, gracias por la cantidad de paroladas que nos echamos en la cocina, por cada ratito de dispersión hablando de niños, de cole, de bodas, de chismes... Gracias por apoyarme y animarme siempre, por

darme las fuerzas que necesitaba cada vez que iba a por ellas a la cocina. ¡No cambies!

Haciendo memoria desde el día en que Jesús me propuso empezar hasta hoy, en todos los recuerdos que me vienen a la cabeza, está Sabela. Celebraste mi llegada, me hiciste sentir una más desde el principio, me enseñaste todo lo que sé con el mayor de los entusiasmos, te quedaste hasta las mil cuando había muestreos y veníamos los fines de semana si hacía falta, ensayaste mis presentaciones hasta la saciedad y las sufriste también. Salimos y viajamos. Cuando vivías fuera, seguías cerca. Cuando nació Lía, aquí estabas. Siempre estás. Gracias por estar. Gracias por ser mi amiga de esa manera. Gracias por todos y cada uno de los cafés, cañas, llamadas de teléfono, consejos y sonrisas que me has dedicado y que sé que me seguirás dando, sea donde sea.

Carmenzocha, mi rubi, a pesar de que ahora estés fuera una parte de ti se quedó aquí. Gracias por acompañarme en este camino y alegrarme los días cuando estabas aquí. Gracias por hacerme ver las cosas desde un prisma diferente y enseñarme a pelear. Gracias por tu amistad.

Gracias Javi por las mil conversaciones y debates, por un sinfín de expresiones variadas y por invitarme a tu boda...jajajaja. Por tus consejos, siempre bienvenidos y por tu cariño. ¡Te echamos de menos!

Gracias Noe por tu punto alocado y la manera de ilusionarte por las cosas. Gracias por poner un unicornio en mi vida. ¡Arre unicornio!

Gracias Aide por compartir conmigo un millón de momentos, de canciones (a veces con poco acierto...) y de sensaciones. Espero seguir compartiéndolas más adelante en una nueva etapa.

Gracias Diego por las risas en el laboratorio, entre la demostración de la teoría de proyectiles con smint, las “contininiciones” y los papelitos, nos alegras los días.

Gracias Kike por regalarme momentos surrealistas de explicaciones imposibles. Gracias Miguel por hacerme pensar en cuáles son mis sueños. Gracias Rox, Mari, Ale, David y Nuria por compartir conmigo alguna etapa de vuestras vidas. Gracias a Phillip por hacer que me pusiera las pilas con el inglés a marchas forzadas y por preocuparte aún a día de hoy por como estoy. Gracias Imen por dejarnos tus expresiones locas. Gracias a Bea Santos, Sergio, Rubén, Maika, Álvaro, Alberto, Manu, Rita, Greta, Rim, Carlos y todos los que habeis pasado por aquí, porque cada uno de vosotros me habeis regalado algo.

A mi familia de allá. Gracias a mis niñas, mis churriñas de Lalín, Male, Mery, Mónica, Nuria, Oli, Olalla, Pul, Valen y Rocío. Gracias por animarme siempre, por darme confianza en mí misma, por crecer conmigo, más cerca o más lejos, pero juntas.

A Alfonso e Isabel, gracias por tratarme como a una hija, por la confianza y la generosidad que habeis tenido conmigo. Gracias por dejarme disponer siempre de vuestro tiempo. Gracias por las comidas de los viernes, por recoger a Lía en la guardería y llevarla de paseo cuando yo no puedo. Gracias por todo.

A mi hermana Cris. Gracias por enseñarme mil cosas, por darme mil consejos, por tirar de mí, por los tirones de orejas y por los abrazos, por estar ahí siempre. Por animarme a todo. Eres mi ejemplo y mi guía, quiero ser como tú.

A Carlos, Susana, Santi, Zoe, Aitana, Mauro y al resto de mi familia, por darme esos momentos de calidad cada vez que nos

juntamos y hacer que me olvidase por un ratito de las cosas que tengo pendientes. Un recuerdo cariñoso para Malta.

A mis padres, gracias por vuestra paciencia infinita conmigo. Por el apoyo que siempre me habeis dado y por creer siempre en mí. Gracias por vuestra fuerza y vuestro empeño en hacer bien las cosas. Gracias por haber currado tanto para que hoy pueda estar escribiendo esto.

Nadie sabe mejor que Edu cómo ha sido todo este proceso. Gracias por estar tirando de mí, alegrándote con lo bueno y apoyándome en cada momento malo. Gracias por hacerme reír y por enseñarme a disfrutar de las pequeñas cosas, por quererme y demostrármelo. Gracias por ayudarme a terminar esta tesis, por darme el empujón definitivo que necesitaba cuando estaba más desmotivada. Gracias por acompañarme. Te quiero.

Lía, mi niña. Eres muy pequeña y no entiendes nada de esto. Pero gracias por recibirme con una sonrisa y un abrazo fuerte cada vez que llego a casa después de pasarme el día en el CIBUS, perdonándome todas las horas que te robé de parque y juegos. Gracias por obligarme a ser mejor persona y enseñarme, desde el momento en que te vi, qué es lo importante de la vida. Te quiero muchísimo.

PUBLICACIONES

RELACIÓN DE PUBLICACIONES

- **Diéguez, A.L.**, Balboa, S., Magnesen, T., Jacobsen, A. y Romalde, J.L. 2017. Comparative study of the culturable microbiota present in two different rearing systems, FTS and RAS, in a Great scallop hatchery. *Aquaculture*, enviado.

Índice de impacto: 2,570; Q1 en *Fisheries Sciences*.

- **Diéguez, A.L.**, Jacobsen, A., Magnesen, T. y Romalde, J.L. 2015. *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., isolated from Great scallop (*Pecten maximus*) broodstock and emended description of *Sinobacterium caligoides*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 108: 983-991.

Índice de impacto: 1,944; Q3 en *Microbiology*.

- **Diéguez, A.L.**, Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L. 2017. *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. and *Neptuniibacter marinus* sp. nov., two novel species isolated from a Great scallop (*Pecten maximus*) hatchery in Norway and emended description of the genus *Neptuniibacter*. *Systematic and Applied Microbiology* 40: 80-85.

Índice de impacto: 3,931; Q1 en *Microbiology*.

- **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2017. Draft genome sequences of *Neptuniibacter* sp. strains LFT 1.8 and ATR 1.1. *Genome announcement* 5 (5): e01541-16

Revista Open Access: American Society for Microbiology

- **Diéguez, A.L.**, Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L. 2017. *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 1327-1332.

Índice de impacto: 2,134; Q3 en *Microbiology*.

- **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2017. Complete genome sequence of *Arcobacter* sp. strains LFT 1.7 isolated from Great scallop (*Pecten maximus*). *Genome announcement* 5 (6): e01617-16.

Revista Open Access: American Society for Microbiology

- **Diéguez, A.L.**, Pichon, P., Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L. 2017. Complete characterization of new isolates of *Neptunomonas phycophila* leads to emend its description and opens possibilities of biotechnological applications. *MicrobiologyOpen*, e519. doi: 10.1002/mbo3.519

Índice de impacto: 2,747; Q2 en *Microbiology*.

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

Beaz-Hidalgo, R., **Diéguez, A.L.**, Cleenwerck, I., Balboa, S., Doce, A., de Vos, P. y Romalde, J.L. 2010. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. Syst. Appl. Microbiol. 33: 311-315. Índice de impacto: 3,075. Q1 en *Microbiology*.

Diéguez, A.L., Beaz-Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., de Vos, P. y Romalde, J.L. 2011. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov., isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2406-2411. Índice de impacto: 2,268. Q3 en *Microbiology*.

Balboa, S., Doce, A., **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2011. Evaluation of different species-specific protocols for the detection of *Vibrio tapetis*. J. Invertebr. Pathol. 108: 85-91. Índice de impacto: 2,064. Q1 en *Zoology*.

Levicán, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., **Diéguez, A.L.**, Romalde, J.L. y Figueras, M.J. 2012. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. Syst. Appl. Microbiol. 35: 133-138. Índice de impacto: 3,288; Q1 en *Microbiology*.

Lasa, A., **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2013. *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the Splendidus clade in the genus *Vibrio*. Syst. Appl. Microbiol. 36: 96-100. Índice de impacto: 3,310. Q1 en *Microbiology*.

- Romalde, J.L., **Dieguez, A.L.**, Lasa, A., y Balboa, S. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. Front Microbiol. 4: 413. Índice de impacto: 3,989; Q1 en *Microbiology*.
- Lasa, A., **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2014. *Vibrio cortegadensis* sp. nov., isolated from clams. Antonie Van Leeuwenhoek. 105: 335-341. Índice de impacto: 1,806; Q3 en *Microbiology*.
- Lasa, A., **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2015. Description of *Lacinutrix venerupis* sp. nov.: A novel bacterium associated with reared clams. Syst. Appl. Microbiol. 38: 115-119. Índice de impacto: 3,691. Q1 en *Microbiology*.
- Lasa, A., Pichon, P., **Diéguez, A.L.** y Romalde, J.L. 2016. *Marinomonas gallaica* sp. nov. and *Marinomonas atlantica* sp. nov., isolated from reared clams (*Ruditapes decussatus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 3183-3188. Índice de impacto: 2,134. Q3 en *Microbiology*.
- Gerpe, D., Buján, N., **Diéguez, A.L.**, Lasa, A. y Romalde, J.L. 2017. *Kiloniella majae* sp. nov., isolated from spider crab (*Maja brachydactyla*) and pullet carpet shell clam (*Venerupis pullastra*). Syst. Appl. Microbiol. 40: 274-279. Índice de impacto: 3,931. Q1 en *Microbiology*.

CAPÍTULOS DE LIBROS

- Romalde, J.L., **Diéguez, A.L.**, Doce, A., Lasa, A., Balboa, S., López, C., Beaz-Hidalgo, R. 2012. Advances in the Knowledge of the microbiota associated with clams from natural beds, Pp: 166-190. En F. da Costa (Ed.) *Clam Fisheries and Aquaculture*. Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-62257-518-3.

Balboa, S., Lasa, A., Gerpe, D., **Diéguez, A.L.**, Romalde, J.L. 2016. Microbiota associated to clams and oysters: a key factor for culture success, pp: 39–66. En J.L. Romalde (Ed.) *Oysters and clams: cultivation, habitat threats and ecological impact*. Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-63485-074-2.

Estudio comparativo de la microbiota asociada a vieira (*Pecten maximus*) en diferentes sistemas de cultivo intensivo en criadero.

RESUMEN

El alto valor comercial de la vieira *Pecten maximus*, así como la existencia de mercados ya establecidos en Europa y la sobreexplotación de los bancos naturales, hacen que el desarrollo de su cultivo sea un interesante negocio en muchos países. A pesar de los esfuerzos realizados todavía no se ha conseguido establecer una producción comercial debido, fundamentalmente, a la alta tasa de mortalidades larvarias detectadas además del escaso desarrollo de la tecnología utilizada en los criaderos.

El proyecto en el que se engloba este trabajo trata de optimizar técnicas para la producción de larvas de vieira en criaderos comerciales utilizando dos sistemas de producción diferentes: el sistema de flujo continuo de agua (FTS), en los que la cantidad de agua y energía necesaria hacen que presente un elevado coste de producción, y el sistema de recirculación de agua (RAS) en el que no sólo la cantidad de agua y energía necesaria se reduce considerablemente sino que además proporcionan un mejor control de la calidad del agua, por lo que el coste de producción disminuye. Nuestro trabajo se centra en el análisis y comparación de la microbiota asociada tanto a las larvas como a cada uno de los compartimentos de los dos sistemas utilizados, además de su evolución a lo largo de un ciclo de producción. Los resultados obtenidos muestran que los géneros *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella* fueron predominantes en ambos sistemas. La microbiota de larvas y agua parece estar relacionada en ambos sistemas y la evolución y composición de la misma en el

criadero fue bastante similar. Por ello, los sistemas de recirculación parecen ser una buena alternativa en el cultivo de vieira.

Además, en esta memoria se realizó la descripción de cuatro nuevas especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Sinobacterium*, *Neptuniibacter* y *Arcobacter*. El estudio completo del genoma de las especies de *Neptuniibacter* y *Arcobacter* nos permitió detectar las posibles aplicaciones biotecnológicas de *Neptuniibacter* y comprobar la heterogenicidad de las especies de *Arcobacter*.

En esta memoria se recoge también el estudio de un grupo de aislados identificados como *Neptunomonas phycophila* que nos permitió ampliar el rango de hospedador y distribución geográfica de esta especie, así como plantear el estudio en profundidad de la misma como posible degradador de compuestos aromáticos.

PALABRAS CLAVE: microbiota, vieira, sistema de flujo continuo (FTS), sistema de recirculación (RAS), acuicultura.

Estudo comparativo da microbiota asociada á vieira (*Pecten maximus*) en diferentes sistemas de cultivo intensivo en criadeiro.

RESUMO

O alto valor comercial da vieira *Pecten maximus*, así como a existencia de mercados xa establecidos en Europa e a sobreexplotación dos bancos naturais, fan que o desenvolvemento do seu cultivo sexa un interesante negocio en moitos países. A pesar dos esforzos realizados aínda non se conseguiu establecer unha produción comercial debido, fundamentalmente, á alta taxa de mortalidades larvarias detectadas ademais do escaso desenvolvemento da tecnoloxía utilizada nos criadeiros.

O proxecto no que se engloba este traballo tenta optimizar técnicas para a produción de larvas de vieira en criadeiros comerciais utilizando dous sistemas de produción diferentes: o sistema de fluxo continuo de auga (FTS), no que a cantidade de auga e enerxía necesaria fan que presente un elevado custo de produción, e o sistema de recirculación de auga (RAS) no que non só a cantidade de auga e enerxía necesaria redúcese considerablemente, senón que ademais proporciona un mellor control da calidade da auga, polo que o custo de produción diminúe. O noso traballo céntrase na análise e comparación da microbiota asociada tanto ás larvas como a cada un dos compartimentos dos dous sistemas utilizados, ademais da súa evolución ao longo dun ciclo de produción. Os resultados obtidos amosan que os xéneros *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* e *Shewanella* foron predominantes en ambos sistemas. A microbiota de larvas e auga parece estar relacionada en ambos sistemas e a evolución e composición da mesma no criadeiro foi bastante semellante. Por iso, os sistemas de recirculación parecen ser unha boa alternativa ao cultivo de vieira.

Ademais, nesta memoria realizouse a descrición de catro novas especies bacterianas pertencentes aos xéneros *Sinobacterium*, *Neptuniibacter* e *Arcobacter*. O estudo completo do xenoma das especies de *Neptuniibacter* e *Arcobacter* permitiunos detectar as posibles aplicacións biotecnolóxicas de *Neptuniibacter* e comprobar a heteroxenicidade das especies de *Arcobacter*.

Nesta memoria recóllese tamén o estudo dun grupo de illados identificados como *Neptunomonas phycophila* que nos permitiu ampliar o rango de hospedador e distribución xeográfica desta especie, así como plantexar o estudo en profundidade da mesma como posible degradador de compostos aromáticos.

PALABRAS CHAVE: microbiota, vieira, sistema de fluxo continuo (FTS), sistema de recirculación (RAS), acuicultura.

Comparative study of the microbiota associated to Great scallop (*Pecten maximus*) in two different rearing systems in hatchery.

SUMMARY

The high commercial value of the Great scallop (*Pecten maximus*), as well as the existence of established markets in Europe and the overexploitation of the natural beds, make the development of its cultivation an interesting business in many countries. Despite the efforts that have been made, commercial production has not yet been settled, mainly due to the high rate of larval mortalities detected in addition to the poor development of the technology used in the hatcheries.

This work is part of a project which focused on the optimization of techniques for the scallop larvae production in commercial hatcheries using two different systems: Flow-Through System (FTS), in which the amount of water and energy required implies a high cost of production and Recirculating Aquaculture System (RAS) in which, not only the quantity of water and energy required is considerably reduced but also provides a better control of water quality and thus the costs of production decreases. Our work focuses on the analysis and comparison of the microbiota associated to larvae and each of the compartments of the hatchery using these two different systems. In addition, the evolution of the microbiota along the cycle of production was also studied. The results obtained showed that the genera *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* and *Shewanella* were predominant in both systems. The microbiota of larvae and water seems to be related in both systems as well as its composition and the evolution was quite similar. Therefore, recirculation systems seem to be a good alternative in scallop culture.

In addition, four new bacterial species belonging to the genera *Sinobacterium*, *Neptuniibacter* and *Arcobacter* were described in this memory. The complete genome study of the *Neptuniibacter* and *Arcobacter* species allowed us to detect the possible biotechnological applications of *Neptuniibacter* and verify the heterogenicity of the *Arcobacter* species.

A group of selected isolates identified as *Neptunomonas phycophila* was also studied in this report, allowing us to expand the host range and geographical distribution of this species, as well as to propose the in-depth study of this species as a possible degrading bacteria of aromatic compounds.

KEY WORDS: microbiota, scallop, Flow-Through System (FTS), Recirculating Aquaculture System (RAS), aquaculture.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. LA ACUICULTURA DE MOLUSCOS	13
1.1.1. Cultivo de vieira. Datos globales.....	16
1.2. LA VIEIRA <i>Pecten maximus</i>	19
1.2.1. Anatomía externa e interna de la vieira.....	19
1.2.2. Ciclo biológico	23
1.2.2.1. Desarrollo gonadal y desove	23
1.2.2.2. Desarrollo embrionario y larvario	24
1.2.2.3. Fijación y metamorfosis.....	25
1.2.3. Ecología de la vieira: distribución y comportamiento.....	26
1.3. CULTIVO EN CRIADERO	28
1.3.1. Calidad, captación y tratamiento del agua.....	28
1.3.2. Instalaciones de un criadero	32
1.3.3. Cultivo de microalgas	33
1.3.4. Acondicionamiento de reproductores	34
1.3.5. Desove y manipulación de cigotos.....	36
1.3.6. Cultivo de larvas y semilla.....	37
1.3.7. Control de microorganismos en el criadero y buenas prácticas	39
1.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	40
1.4.1. Flujo continuo (FTS)	40
1.4.2. Recirculación (RAS)	42
1.5. MICROBIOTA ASOCIADA A MOLUSCOS.....	44
1.5.1. Microbiota asociada a moluscos en criadero.....	49
1.5.2. Microorganismos perjudiciales	55
1.5.2.1. Parásitos.....	56
1.5.2.2. Virus	56
1.5.2.3. Bacterias.....	58
1.5.3. Microorganismos beneficiosos	65

2. OBJETIVOS	71
3. RESULTADOS	75
3.1. Comparación de la microbiota asociada a vieira (<i>Pecten maximus</i>) en dos sistemas de cultivo	77
3.1.1. Comparative study of the culturable microbiota present in two different rearing systems, FTS and RAS, in a Great scallop hatchery	79
3.2. Caracterización y descripción de nuevos taxones microbianos.....	119
3.2.1. <i>Sinobacterium norvegicum</i> sp. nov., isolated from Great scallop (<i>Pecten maximus</i>) broodstock and emended description of <i>Sinobacterium caligoides</i>	121
3.2.2. <i>Neptuniibacter pectenicola</i> sp. nov. and <i>Neptuniibacter</i> <i>marinus</i> sp. nov., two novel species isolated from a Great scallop (<i>Pecten maximus</i>) hatchery in Norway and emended description of the genus <i>Neptuniibacter</i>	135
3.2.3. Draft genome sequences of <i>Neptuniibacter</i> sp. strains LFT 1.8 and ATR 1.1.	145
3.2.4. <i>Arcobacter lekithochrous</i> sp. nov., isolated from a molluscan hatchery.	149
3.2.5. Complete genome sequence of <i>Arcobacter</i> sp. strain LFT 1.7 isolated from Great scallop (<i>Pecten maximus</i>) larvae.	161
3.2.6. Complete characterization of new isolates of <i>Neptunomonas phycophila</i> leads to emend its description and opens possibilities of biotechnological applications.....	165
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	181
5. CONCLUSIONES.....	193
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199

ABREVIATURAS

ANI: Valor medio de identidad nucleotídica (*Average Nucleotide Identity*).

ASW: Agua de mar artificial (*Artificial Sea Water*).

BCCM/LMG: Colección de cultivos de microorganismos belga (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*).

BMA: Medio basal con agar (*Basal Medium Agar*).

CAIM: Colección de microorganismos de importancia acuícola (*Collection of aquatic important microorganisms*) (México).

CCAP: Colección de cultivos tipo de algas y protozoos (*Culture Collection of Algae and Protozoos*) (Escocia).

CCDA: Agar *Campylobacter* carbón y desoxicolato (*Campylobacter Charcoal Deoxycholate Agar*).

CECT: Colección española de cultivos tipo.

CFB: *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*.

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas regularmente (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).

DDH: Hibridación ADN-ADN (*DNA-DNA hybridization*).

DSMZ: Colección alemana de cultivos tipo (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*).

eDDH: Hibridación ADN-ADN *in silico* (*In silico DNA-DNA hybridization*)

ERIC-PCR: Amplificación por PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*).

FAME: Ácidos grasos metil-éster (*Fatty Acid Methyl Esters*).

fHb: Flavohemoglobina.

FTS: Sistemas de flujo continuo (*Flow-Through System*).

GDP: Producto Interior Bruto (*Gross Domestic Product*).

GGDC: Calculador de distancias entre genomas (*Genome to Genome Distance Calculator*).

HPLC: Cromatografía fina de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*).

MA: Agar marino (*Marine Agar*).

ML: Maximum- Likelihood.

MLSA: Análisis de secuencias multilocus (*Multilocus Sequences Analysis*).

NA: Agar nutritivo (*Nutrient Agar*).

NJ: Neiborg-Joining.

ONPG: Orto-nitrofenil- β -galactósido.

PAH: Hidrocarburo aromático policíclico (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*).

RAS: Sistemas de recirculación de agua (*Recirculating Aquaculture System*).

RAST: Anotación rápida mediante tecnología de subsistemas (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*).

REP-PCR: Amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*Repetitive Extragenic Palindromic PCR*).

SEM: Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*).

SSW: Agua de mar estéril (*Sterile Sea Water*).

TCBS: Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa.

TSA: Agar tripticaseína soja (*Tryptone Soy Agar*).

TSI: Agar-hierro-triple azúcar (*Triple Sugar Iron Agar*).

TTC: 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (*2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride*).

RESUMEN

La acuicultura ha experimentado en las últimas décadas un gran crecimiento debido a varios factores como el aumento de la población mundial y la demanda, la mejora en el conocimiento de las especies cultivadas o el desarrollo de las técnicas empleadas para su cultivo. De hecho, la producción acuícola mundial supuso el aporte de casi el 50% de los productos pesqueros destinados al consumo humano. El 16% de esta producción correspondió, en el año 2014, al cultivo de moluscos. Europa es el segundo productor de moluscos después de Asia, con un 3,9% del mercado siendo España el mayor productor en el continente, con el cultivo de mejillón en Galicia como principal representante.

A pesar de las estrictas normativas impuestas por la Unión Europea y sus distintos gobiernos para la instalación de nuevos cultivos y criaderos, se están realizando numerosos esfuerzos en el desarrollo de los cultivos de algunas especies de bivalvos de alto valor comercial, como es el caso de la vieira *Pecten maximus*. Uno de los principales factores limitantes de este cultivo es la obtención de una semilla de calidad. Esta se obtiene a partir de reproductores capturados en el medio marino, lo cual supone la sobreexplotación de los bancos naturales y la inestabilidad en el abastecimiento de los mercados. Otro factor limitante es la falta de desarrollo e innovación en los sistemas de producción, ya que los sistemas de cultivo usados tradicionalmente son los sistemas estáticos, en los que se realiza un cambio de agua cada 3 o 4 días y es frecuente la adición de antibióticos, o los cultivos en flujo continuo, que implican un elevado gasto de agua y energía y, por lo tanto, en algunas especies, una baja rentabilidad del cultivo. El diseño y experimentación de otros sistemas para el cultivo de moluscos es, consecuentemente, un punto fundamental en el desarrollo de una industria productora.

Los criaderos de moluscos bivalvos constituyen ecosistemas completos, en los que se producen numerosas interacciones físicas,

químicas y microbiológicas entre los distintos nichos (compartimentos). Son, por lo tanto, sistemas complejos pero, a pesar de ello, la mayoría de los estudios realizados se han centrado, desde el punto de vista microbiológico, en la detección y prevención de patógenos.

Este trabajo se ha realizado en el marco de un proyecto europeo cuyo principal objetivo era la obtención de semilla de calidad y mejora de los sistemas de producción. En esta tesis doctoral determinamos la microbiota asociada a un criadero de *P. maximus* en Noruega, utilizando dos sistemas de producción diferentes, un sistema de flujo continuo de agua (FTS, por sus siglas en inglés: *Flow-Through System*) y otro de recirculación de agua (RAS, por sus siglas en inglés: *Recirculation Aquaculture System*). En este último el agua es reutilizada tras ser tratada con diversos filtros mecánicos y biológicos. Este método de cultivo supone un ahorro en el gasto de agua y energía e implica un mayor control biológico en el cultivo.

Los resultados obtenidos en estos estudios mostraron que los géneros mayoritarios en el criadero en ambos sistemas eran *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter* y *Shewanella*. Estos se han distribuido a lo largo de casi todos los compartimentos, mostrando un comportamiento ubicuo, con pocas excepciones como la ausencia de vibrios en el agua tratada con luz ultravioleta o la de *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter* y *Shewanella* en las muestras de microalgas. Las gónadas de los reproductores analizadas antes y después de la puesta, mostraron una gran diversidad bacteriana. Muchos de estos taxones fueron exclusivos de reproductores como *Kordia*, *Microbulbifer* o *Sinobacterium*, mientras que otros como *Vibrio* o *Shewanella* presentaron un patrón de distribución desde los reproductores hasta el agua y larvas, lo que nos lleva a pensar en una posible transmisión vertical de los mismos.

La microbiota de las larvas parece estar fuertemente vinculada a la del agua y las biopelículas, ya que presentan microorganismos comunes. Además, las poblaciones asociadas al agua y las larvas sufren la misma evolución, siendo esta relación más evidente en el sistema FTS. Debido al carácter filtrador de estos animales, la correlación entre la microbiota de las larvas y el agua se entiende fácilmente. Siguiendo este razonamiento, las comunidades bacterianas que encontramos en las muestras de microalgas deberían influir en la microbiota presente en las larvas, pero los únicos microorganismos comunes en ambos compartimentos pertenecían a los géneros *Alteromonas* y *Vibrio*, mientras otros géneros fueron exclusivos del fitoplancton, como *Muricauda* y *Jejuia*.

Las comunidades que colonizaron el biofiltro, analizado solamente en el sistema de recirculación, fueron variadas y de función heterogénea. Además, con el tiempo estas poblaciones aumentaron su diversidad. Al principio del experimento solamente se detectó el género *Vibrio*, el cual fue desplazado por géneros como *Alteromonas*, *Neptuniibacter* o *Aestuariibacter* a lo largo del ciclo de producción.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que un criadero, con todos sus compartimentos, es un sistema altamente complejo en el que las interacciones entre los distintos nichos biológicos son esenciales para el buen funcionamiento del mismo. Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, las diferencias en la microbiota asociada a los distintos sistemas de producción no son importantes, por lo que el sistema de recirculación podría considerarse como una buena alternativa de cultivo para esta especie en aguas noruegas.

Por otro lado, de los más de 200 aislados obtenidos en este ciclo, se seleccionaron cuatro grupos que no pudieron asignarse a una

especie conocida en base a las secuencias del gen 16S ARNr, y para las que realizamos un análisis polifásico completo que nos permitió describirlas como nuevas especies.

Uno de estos grupos estaba formado por 6 aislados procedentes exclusivamente de gónadas de reproductores. Estos presentaron unos porcentajes de similitud entre las secuencias del gen 16S ARNr de 96,97% y 97,63% con *Sinobacterium caligoides*, la única especie conocida del género. El análisis filogenético de estos aislados se realizó en base a los genes 16S ARNr, *rpoB* y *gyrB*. Los resultados obtenidos mostraron que nuestro grupo de cepas se localizaba en una rama muy robusta e independiente a *S. caligoides*. Los resultados de hibridación ADN-ADN (DDH) realizados entre la cepa tipo de *S. caligoides* y la nuestra mostraron un valor de similitud del 46%. Además, con la caracterización bioquímica de los aislados obtuvimos una serie de características diferenciales entre ambas especies como el rango de temperatura de crecimiento, la utilización de dextrina y ácido itacónico como única fuente de carbono o la presencia de gelatinasa en los aislados noruegos. Todas estas evidencias apoyaron la descripción de una nueva especie para la que se propuso el nombre de *Sinobacterium norvegicum* sp. nov.

Uno de los géneros mayoritarios encontrados en el criadero, como ya se ha mencionado anteriormente, es el género *Neptuniibacter*. De todos los aislados obtenidos asignados a este taxón mediante el estudio del gen 16S ARNr, seleccionamos dos grupos que mostraron unos porcentajes de similitud con *N. caesaeriensis* entre el 96,09% y el 97,15%. Se analizaron también las secuencias del gen *rpoB* que, a pesar de la poca información que nos proporciona a la hora de comparar con los taxones cercanos debido a la falta de datos en las bases públicas, nos permitió confirmar la posición independiente de nuestros aislados dentro del género *Neptuniibacter* y comprobar que

todos nuestros aislados formaban a su vez dos grupos individuales. Se seleccionó una cepa tipo de cada grupo para realizar la secuenciación completa de su genoma, lo que nos permitió calcular el valor de hibridación ADN-ADN *in silico* (eDDH) y el promedio de identidad nucleotídica (ANI, por sus siglas en inglés *Average Nucleotide Identity*). Los aislados presentaron un porcentaje de hibridación menor al 20% con *N. caesaeriensis* mientras que los valores de ANI se situaron por debajo del 73% en ambos casos. En cuanto a la caracterización fenotípica, se encontraron varias características diferenciales entre los dos grupos de aislados noruegos, como la ausencia de catalasa en los aislados de agua o la de gelatinasa en los aislados de larvas. Además, nuestros aislados también se pudieron diferenciar del resto de especies conocidas por el uso de diferentes compuestos como única fuente de carbono o la capacidad de crecer a 4°C que presentan los aislados del criadero. Así, apoyados por todos estos resultados, describimos dos especies nuevas para las que propusimos los nombres de *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. y *Neptuniibacter marinus* sp. nov.

El último de los grupos seleccionados estaba formado por 4 aislados procedentes de larvas y agua de tanque. Al igual que en los grupos anteriores, la primera identificación se realizó a través de la secuencia del gen 16S ARNr, que mostró un porcentaje de similitud bajo entre los aislados noruegos y *Arcobacter nitrofigilis*, oscilando entre el 94,77% y el 95,32%. El análisis filogenético en base a este gen mostró que las cepas se situaban en un grupo muy robusto pero aislado del resto de especies del género. Para un estudio en profundidad se secuenció el genoma completo de la cepa tipo de este grupo. De este genoma se seleccionaron 5 genes esenciales, *atpA*, *hsp60*, *gyrA*, *gyrB* y *rpoB* para un análisis multilocus. Con este análisis se confirmaron los resultados obtenidos con el gen 16S ARNr, localizando este grupo en una rama independiente en el género

Arcobacter. Además, a partir de los datos del genoma se calcularon los valores de eDDH que oscilaron entre el 18,30% con *A. anaerophilus* y el 20,50% con *A. butzleri*. Los valores más altos de similitud obtenidos mediante OrthoANI fueron de 76,29% con *A. defluvii*. En cuanto a la caracterización fenotípica realizada, los aislados de Noruega mostraron una baja reactividad en los medios comúnmente empleados para las especies de este género, por lo que mostraron un perfil negativo para la mayoría de las pruebas diferenciales clásicas. A pesar de esto, nuestros aislados se pudieron diferenciar de las especies más cercanas mediante el perfil enzimático o el crecimiento con medios con safranina, entre otras características. Estas cepas requieren además, un aporte de sales marinas a los medios de crecimiento al igual que ocurre en otras especies de este género aisladas a partir de organismos marinos. Todos estos resultados, además de los obtenidos mediante el estudio de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas respiratorias, nos permitieron describir una nueva especie a la que llamamos *Arcobacter lekithochrous* sp. nov.

Las secuencias completas de los genomas obtenidas para *N. pectenicola*, *N. marinus* y *A. lekithochrous* se anotaron mediante el servidor RAST. Este análisis reveló posibles aplicaciones biotecnológicas para ambas especies de *Neptuniibacter* en biodegradación de compuestos aromáticos. Además, se detectó la presencia de secuencias CRISPR en el genoma de *N. pectenicola*. El genoma de la cepa tipo de *A. lekithochrous* presentó genes de resistencia a antibióticos y a compuestos tóxicos como el arsénico, numerosos genes implicados en el metabolismo del nitrógeno así como en la codificación de hemoglobinas y flavohemoglobinas, que aportan protección frente al estrés nitrosativo.

Además, se estudiaron otros 5 aislados procedentes de gónada de reproductores que se identificaron como *Neptunomonas phycophila*,

RESUMEN

una especie descrita con anterioridad en muestras procedentes de Puerto Rico. Las diferencias encontradas entre la cepa tipo de la especie y nuestros aislados dieron lugar a una corrección de la descripción de la especie, además de ampliar el rango de hospedador y la distribución geográfica de la misma. El estudio del genoma completo de estas bacterias abrió la puerta a un estudio en profundidad de sus posibles aplicaciones biotecnológicas ya que, al igual que en los aislados de *Neptuniibacter*, estas cepas mostraron genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos.



1. INTRODUCCIÓN



1.1. LA ACUICULTURA DE MOLUSCOS

La acuicultura se define como la cría y cultivo de organismos acuáticos, ya sean peces, moluscos, crustáceos o plantas que se realiza en aguas continentales o costeras y que implica, por un lado, la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y por otro la propiedad individual o empresarial de las poblaciones cultivadas (FAO, 2008).

Se estima que en el año 2050 la población mundial habrá alcanzado los 9.600 millones de personas por lo que la demanda de alimentos se incrementará. Uno de los principales retos será cubrir esta demanda intentando proteger los recursos naturales del planeta y evitando la sobreexplotación de los mismos. La acuicultura se presenta como uno de los sectores con mayor sostenibilidad y capacidad de aportar un producto de alto valor nutritivo. De hecho, debido al aumento demográfico ya ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos años y casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación humana proceden de este sector (FAO, 2014).

El éxito actual de la acuicultura marina se debe fundamentalmente a los avances en el conocimiento de la biología de las especies cultivadas en paralelo con el desarrollo de importantes innovaciones tecnológicas que facilitan la producción de estos animales.

Según la FAO (2014), la acuicultura mundial produjo en 2014 un total de 101,1 millones de toneladas de productos del mar entre los que se encuentran peces, moluscos, crustáceos, anfibios, tortugas, erizos, pepinos de mar, ascidias, medusas y algas. Los moluscos representaron el 16% de esta producción acuícola mundial, lo que equivale a 16,1 millones de toneladas (Fig.1), de las cuales Europa

INTRODUCCIÓN

aportó el 3,9% (631.789 t) con un valor en primera venta de 1.180 millones de euros (Fig.2).

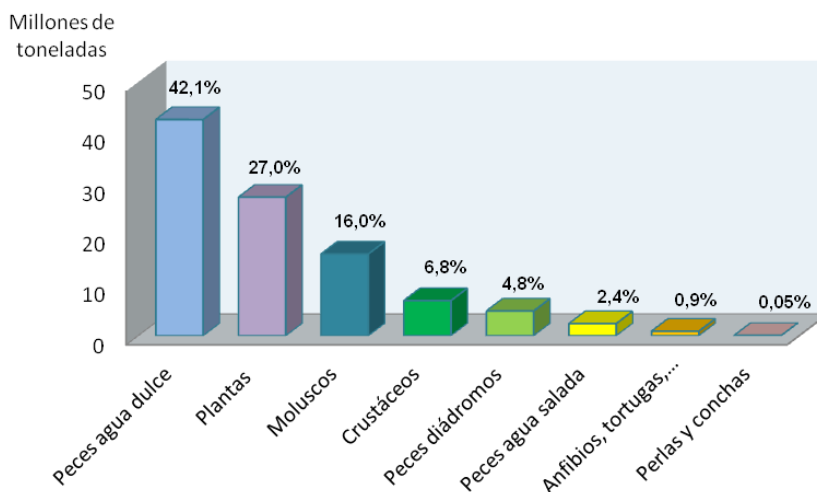


Figura 1: Datos de producción acuícola mundial de distintas especies animales y vegetales en el año 2014. Fuente: FAO-FIGIS, 2017.

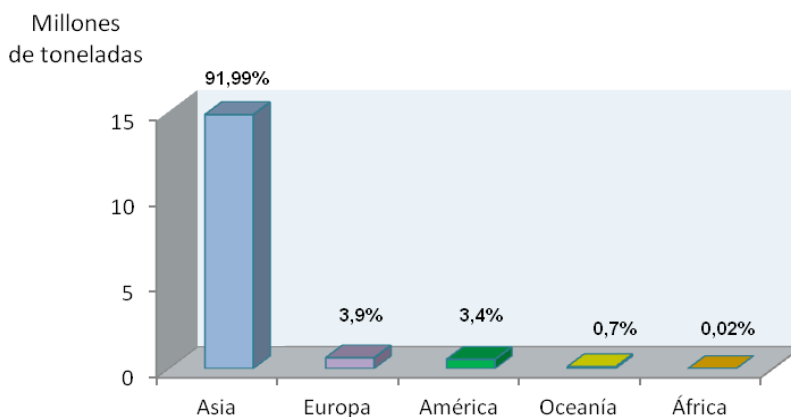


Figura 2: Porcentaje de producción de moluscos procedentes de acuicultura por continentes. Fuente: FAO- FIGIS, 2017

INTRODUCCIÓN

Esta cantidad se ha ido reduciendo en los últimos años, aunque el valor económico de los moluscos europeos se ha incrementado. La principal razón para este descenso parece ser la importación de moluscos procedentes de otros países donde los costes de producción son más bajos. El principal país productor de moluscos en Europa es España, seguido por Francia e Italia y la principal especie en la producción es el mejillón (79,1%) seguida a distancia por ostras (15,1%), almejas (6%) y pectínidos, incluyendo vieira, volandeira y zamburiña (0,3%) (Fig.3; Fig.4).

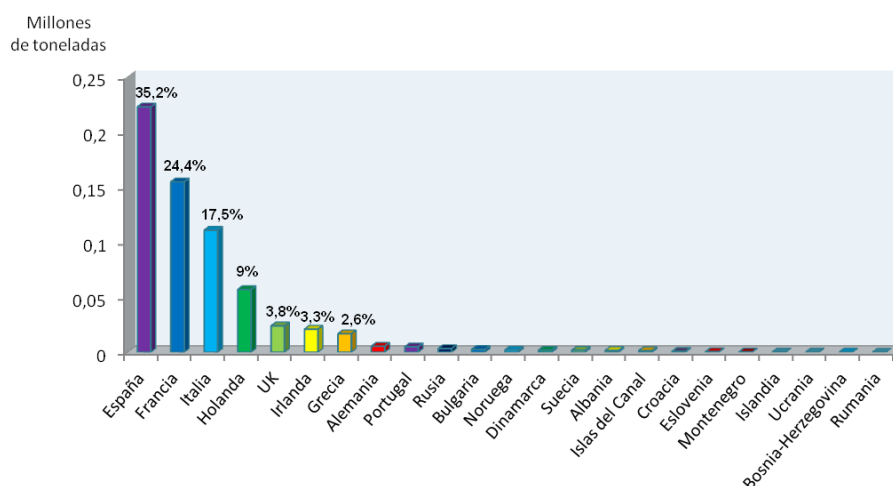


Figura 3: Porcentaje de producción de moluscos en los distintos países europeos.
Fuente: FAO- FIGIS, 2017.

INTRODUCCIÓN

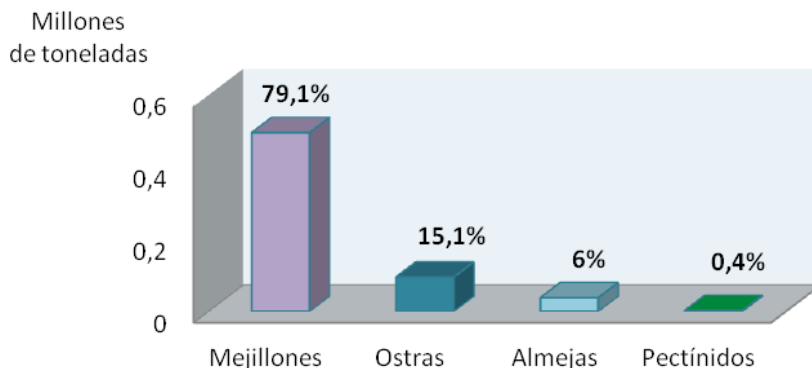


Figura 4: Porcentaje de los distintos moluscos producidos en Europa en 2014. Fuente: FAO- FIGIS, 2017.

1.1.1. Cultivo de vieira. Datos globales

El porcentaje de pectínidos producidos en Europa es todavía muy bajo. Si observamos los datos de producción de estos moluscos bivalvos en el continente el número de toneladas asciende hasta las 85.054 en el año 2014. De estas, 2.460 t corresponden a las obtenidas a través de la acuicultura. La vieira *Pecten maximus* es el pectínido más apreciado en los mercados europeos y de mayor valor económico, aunque las cifras de producción de esta especie son casi anecdóticas, ya que sólo 38 toneladas procedieron de cultivos en un total de 55.764 t obtenidas en el año 2014 (FAO, 2014). Los principales aportes de *P. maximus* a los mercados europeos provienen, por lo tanto, de capturas pero se espera que esta situación cambie en los próximos años ya que, actualmente, los bancos naturales de *P. maximus* en Europa están sobreexplotados o cerca de estarlo. Las vieiras viven en distribuciones agregadas y son relativamente inmóviles. Esto significa que son fácilmente detectadas y capturadas. Además, su método de reproducción, una vida planctónica larga y la alta sensibilidad ambiental

INTRODUCCIÓN

que presentan estos moluscos, tienen como resultado grandes variaciones anuales y espaciales en la fijación larvaria y supervivencia. Como consecuencia, las grandes variaciones en el suministro son características para estos bivalvos. Con el fin de proporcionar un aporte constante de vieiras en los mercados europeos en los años 70 se realizaron los primeros intentos de cultivo en Europa y se desarrollaron los primeros criaderos y semilleros.

En España, la captura de vieira se ha realizado en las Rías gallegas al menos desde 1870, aunque sólo hay datos disponibles desde 1962 (Román, 1991). Los datos oscilan de un año a otro, llegando a alcanzar las 675 t en el año 1996 y decayendo hasta las 84 toneladas en 2014 (Fig.5).

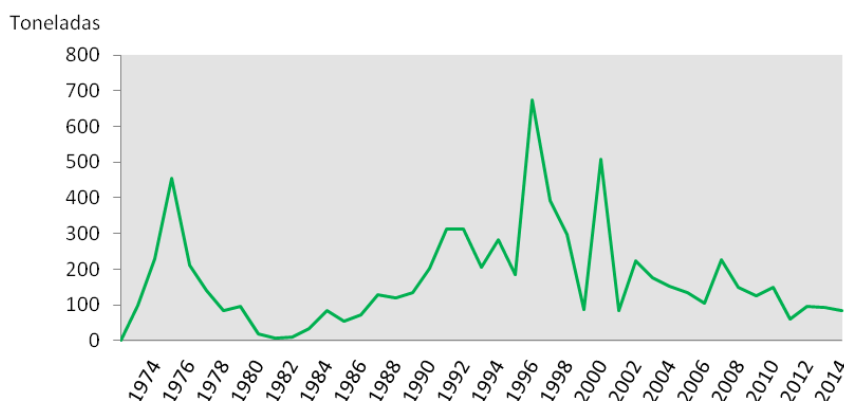


Figura 5: Capturas de *Pecten maximus* en España. Fuente: FAO-FIGIS, 2017.

En Noruega, la explotación comercial de este bivalvo es relativamente reciente y fundamentalmente se basa en capturas de bancos naturales. Ha estado limitada inicialmente por las condiciones desfavorables del fondo junto a la abundancia de algas que dificultaban la recogida (Wiborg y Bøhle, 1974), pero los importantes esfuerzos

INTRODUCCIÓN

realizados en el desarrollo de una industria de moluscos han derivado en un incremento de capturas en años recientes aumentando hasta las casi 750 toneladas en el año 2014 (Fig.6).

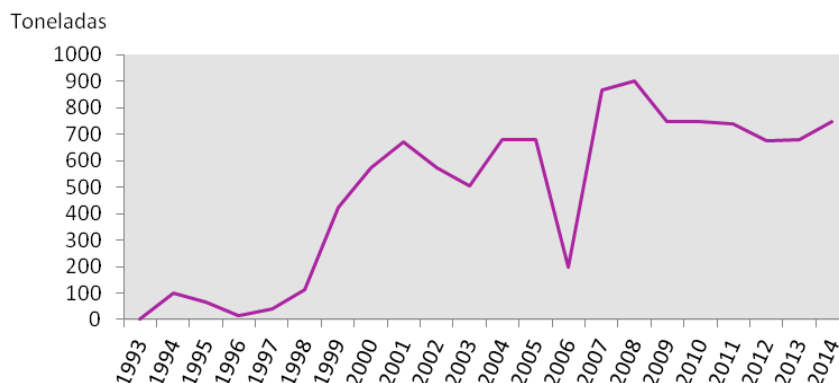


Figura 6: Capturas de *Pecten maximus* en Noruega. Fuente: FAO- FIGIS, 2017.

Motivados por la posibilidad de la sobreexplotación de los bancos naturales, a finales de los años 80 los esfuerzos se centraron en el desarrollo de la tecnología y métodos de cultivo apropiados para los criaderos en aguas noruegas (Strand y Parsons, 2006). En 1987 se construyó un criadero piloto a gran escala en Øygarden que, tras diversos cierres y su transferencia al sector privado, se convirtió en un centro de actividad donde se unen cultivadores, autoridades regionales y centros de investigación para el desarrollo industrial del cultivo de vieira, el cual se centra en la producción de semilla.

1.2. LA VIEIRA *Pecten maximus*

1.2.1. Anatomía externa e interna de la vieira

Las vieiras, *P. maximus*, son animales invertebrados pertenecientes a la Familia *Pectenidae* en la clase *Bivalvia* y filo *Mollusca*. *Pecten maximus* es una vieira de gran talla que alcanza un tamaño de 150 mm, aunque se han llegado a observar individuos de 214,3 mm (Minchin, 1993; Quigley, 2015). El rasgo más destacado de los bivalvos es la existencia de dos valvas de igual o diferente tamaño que pueden cerrarse completamente sobre las partes blandas del interior. Las valvas están formadas principalmente de carbonato cálcico y tienen tres capas: la capa interna o nacarada, la capa intermedia o brillante, que forma la práctica totalidad de la concha, y la capa externa o periostraco, una capa pardusca y áspera que los animales más viejos suelen perder debido a la abrasión o al desgaste. Las vieiras son moluscos inequivalvos, con una valva superior plana (valva izquierda) y una valva inferior curvada (valva derecha). Ambas valvas presentan entre 15 y 17 costillas y numerosas ondulaciones concéntricas y estrías finas. La valva izquierda es generalmente rojiza pero puede variar desde el rosa claro al casi negro. La valva derecha normalmente es de color blanco apagado, amarillenta o parduzca (Fig.7). Ambas valvas están marcadas con bandas, puntos o zigzags rojos, rosas o amarillo brillante. Los anillos de crecimiento son a menudo muy claros en ambas valvas, particularmente en la izquierda (Duncan y col., 2016). Las dos valvas se unen por la parte dorsal, en el **umbo o zona de la charnela**, y la región en el lado opuesto es el margen ventral. La forma de las valvas en las vieiras es más o menos circular, con una aleta a cada lado de la charnela, llamadas **orejas o aurículas**. La cara externa presenta repliegues radiales y en la cara interna se marca la inserción de un único músculo aductor que ocupa una posición casi central.

INTRODUCCIÓN



Figura 7: Anatomía externa de las valvas de *Pecten maximus*. Fuente: Ictio.term. CSIC.

Esta familia presenta uno de los mayores grados de diferenciación anatómica dentro de los moluscos bivalvos. Los órganos son bastante diferentes y se localizan con gran facilidad, aunque forman sistemas altamente complejos en los cuerpos de las vieiras.

La cara interna de la concha está recubierta por unas membranas transparentes y finas que envuelven las partes blandas y se unen a la concha por la zona de la charnela. Estas membranas forman el **manto o velo**, el cual se engrosa en los bordes de la concha, donde puede estar pigmentado o no, y forma pliegues. El borde del manto presenta un número elevado y variable de **tentáculos** sensoriales y órganos fotosensibles llamados **ojos**. El manto modula la entrada y salida de agua en la cavidad corporal, la expulsión de pseudoheces y el movimiento del animal cuando nada, presentando, además función respiratoria.

Las especies monomiarias como las vieiras presentan un único **músculo aductor** ubicado en el centro del cuerpo y que presenta dos divisiones claramente diferenciables: una gran porción anterior (estriada) del músculo que se denomina músculo rápido y se contrae para cerrar las valvas; la porción más pequeña, la parte lisa, conocida

INTRODUCCIÓN

como músculo de cierre, mantiene las valvas en posición cuando se han cerrado o están parcialmente cerradas.

Las vieiras son animales hermafroditas en los que la **gónada** es un órgano bien definido y prominente. Los dos sexos se pueden distinguir a simple vista cuando la gónada está llena ya que la gónada masculina o testículo es blanca y la femenina u ovario es naranja. La gónada está unida al margen anterior del músculo aductor y de su extremo antero-dorsal surge el **pie**, el cual tiene escasa función en los adultos pero en las etapas de larva y juvenil es importante ya que se utiliza para la locomoción. En la parte central del pie hay una abertura desde la cual el animal segrega una sustancia filamentosa y elástica llamada **biso** con la que se puede adherir al sustrato. Esto es importante ya que permite al animal sujetarse y mantener su posición.

El sistema renal es visible y está formado por dos **riñones** pequeños, de color pardo y en forma de saco, apretados contra la parte anterior del músculo aductor. Los riñones vacían en la cavidad paleal a través de grandes hendiduras. En las vieiras, los óvulos y espermatozoides de las gónadas son expulsados a través de los conductos hacia la luz del riñón desde donde pasan a la cavidad paleal.

Situadas en el margen ventral de la gónada se encuentran las dos largas **branquias** en forma de hoja unidas al músculo aductor. Estos órganos son los responsables de la respiración y la filtración parcial del alimento del agua. En la parte anterior de cada branquia se encuentran los llamados **palpos labiales** los cuales se pliegan para formar el aparato labial que cubre la **boca** y facilitan la introducción de alimentos. El bolo alimenticio, amalgamado por el moco, pasa a la boca y a veces es rechazado por los palpos y eliminado por el animal en forma de las denominadas **pseudoheces**. También disponen de un

INTRODUCCIÓN

esófago corto que une la boca y el **estómago**, un saco hueco con cámaras y varias aberturas. El estómago se halla totalmente rodeado por el divertículo digestivo (glándula), una oscura masa de tejido que muchas veces se denomina **hepatopáncreas**. Dentro del estómago hay una abertura que llega hasta un **intestino** muy curvo que se extiende hasta la gónada para terminar en el **recto** y finalmente en el **ano** (Fig.8).

El **corazón** está compuesto por dos **aurículas** y un único **ventrículo** envuelto por un fino **pericardio** transparente posterior al músculo aductor. Del ventrículo salen la aorta anterior y posterior que se ramifican para formar el sistema arterial periférico. El sistema venoso está compuesto principalmente por numerosos senos por los que fluye la hemolinfa a través de los riñones hasta las branquias. Desde las branquias, la hemolinfa vuelve a la aurícula correspondiente a través de un vaso branquial eferente.

Aunque a menudo son difíciles de observar, las estructuras más visibles del sistema nervioso de la vieira son concentraciones de ganglios. El **ganglio visceral** enerva el músculo aductor, la región ventral del manto, branquias y alguna víscera. Los **ganglios pedios** y los **ganglios cerebrales** están fusionados y se sitúan en una posición ligeramente ventral a la boca, unidos al ganglio visceral por un par de conectivos cerebro-visceral. Estos ganglios y los conectivos enervan el resto del cuerpo de la vieira (Helm y Bourne, 2006).

INTRODUCCIÓN

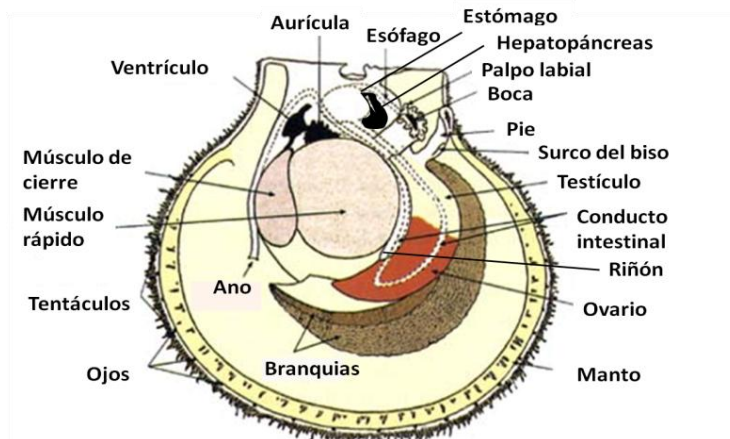


Figura 8: Anatomía interna de *Pecten maximus*. Imagen modificada de Helm y Bourne, 2006.

1.2.2. Ciclo biológico

1.2.2.1. Desarrollo gonadal y desove

En la mayoría de los bivalvos la maduración sexual depende principalmente del tamaño del animal. La producción de óvulos y espermatozoides se denomina gametogénesis y está inducida por la interacción de factores exógenos como la temperatura y salinidad del agua, la cantidad y calidad del alimento del que dispone o el fotoperíodo y factores endógenos como factores neuronales u hormonales (Barber y Blake, 2006), aunque en pectínidos este desove está inducido principalmente por la temperatura del agua (Paulet y col., 1997). Los gametos son liberados al mar, donde se produce la fecundación, dando lugar a la fase embrionaria.

1.2.2.2. Desarrollo embrionario y larvario

Una vez producida la fecundación, el ovocito fecundado sufre una segmentación holoblástica o total dando lugar a una blástula inmóvil que se divide hasta formar una gástrula ciliada (Fig.9), la cual se desarrolla para formar la larva trocófora. Esta larva es de forma ovalada, de 60-80 μm de longitud y dispone de una fila de cilios alrededor del centro con un largo flagelo apical que le facilita la natación. En la vieira *P. maximus* las larvas trocóforas se obtienen 24 h después del desove a temperaturas de entre 16-17 °C (Comely, 1972). Durante esta fase embrionaria las reservas que se encuentran inicialmente en el ovocito representan la única fuente de energía para el embrión, por lo que las larvas que proceden de huevos de mayor tamaño alcanzarán la metamorfosis en menos tiempo (Paulet y col., 1988). La larva trocófora sufre una invaginación dando lugar a la prodisoconcha I que recubrirá las partes blandas del cuerpo y se forma la larva veliger en D o de charnela recta. Este paso representa el primer estadio de la fase larvaria y se alcanza a las 48 h del desove (Le Pennec y col., 2003). La larva D mide entre 115-120 μm y tiene dos valvas, un sistema digestivo completo y un velo ciliado que le permite nadar para mantenerse en la columna de agua y alimentarse captando partículas del fitoplancton. A medida que las larvas crecen, se desarrollan los umbos en la concha cerca de la charnela, lo que da lugar a la larva veliger umbonada o prodisoconcha II. Esta larva sigue creciendo hasta alcanzar los 225-230 μm y desarrolla la mancha ocular, una mancha oscura circular en el centro de cada valva, un pie y branquias rudimentarias. Esta es la larva pediveliger, la cual alcanza este estado entre 30 y 35 días desde la fecundación y marca el final de la vida pelágica de la vieira, ya que entre periodos de actividad natatoria las larvas se asientan y utilizan el pie para arrastrarse por el sustrato. La supervivencia en la fase pelágica depende

INTRODUCCIÓN

fundamentalmente de las condiciones hidrográficas, la disponibilidad de alimento, la abundancia de depredadores y competidores o la presencia de condiciones inusuales como afloramientos de algas tóxicas (Minchin, 1985; Erard-Le-Denn y col., 1990). Cuando la larva pediveliger localiza un sustrato adecuado, ya está preparada para la metamorfosis y para comenzar su existencia bentónica. La larva segrega un bisco desde la glándula bisal del pie, que sirve de sujeción temporal para adherirse al sustrato, como preparación para la metamorfosis (Fernández- Álvarez, 1991; Helm y Bourne, 2006).

1.2.2.3. Fijación y metamorfosis

Hacia el final de la vida larvaria las pediveliger inician la fijación pasando a la fase de post-larva. Este constituye el paso de larva a juvenil, un momento crítico en el desarrollo de los bivalvos ya que el animal deja su actividad natatoria y planctónica para llevar una existencia sedentaria y bentónica. En esta fase de fijación pueden producirse altas mortalidades tanto en criaderos como en bancos naturales. En los bivalvos el proceso de metamorfosis implica cambios en la concha, la pérdida de algunos órganos y el desarrollo o recolocación de otros. El principal órgano que se pierde en la metamorfosis es el velo y los músculos retractores del mismo. Hay una migración general de los órganos que se mantienen después de la metamorfosis y los filamentos de las branquias multiplican su número y longitud (Hodgson y Burke, 1988). Esta branquia es capaz de filtrar alimentos en suspensión un día después de la metamorfosis, asegurando así poca pérdida de la ingestión de alimentos durante la transición (Gruffydd y Beaumont, 1972). La forma del pie cambia gradualmente y las glándulas presentes en el mismo se desarrollan mejor. El bisco secretado se hace más pegajoso después de la metamorfosis (Culliney, 1974).

INTRODUCCIÓN

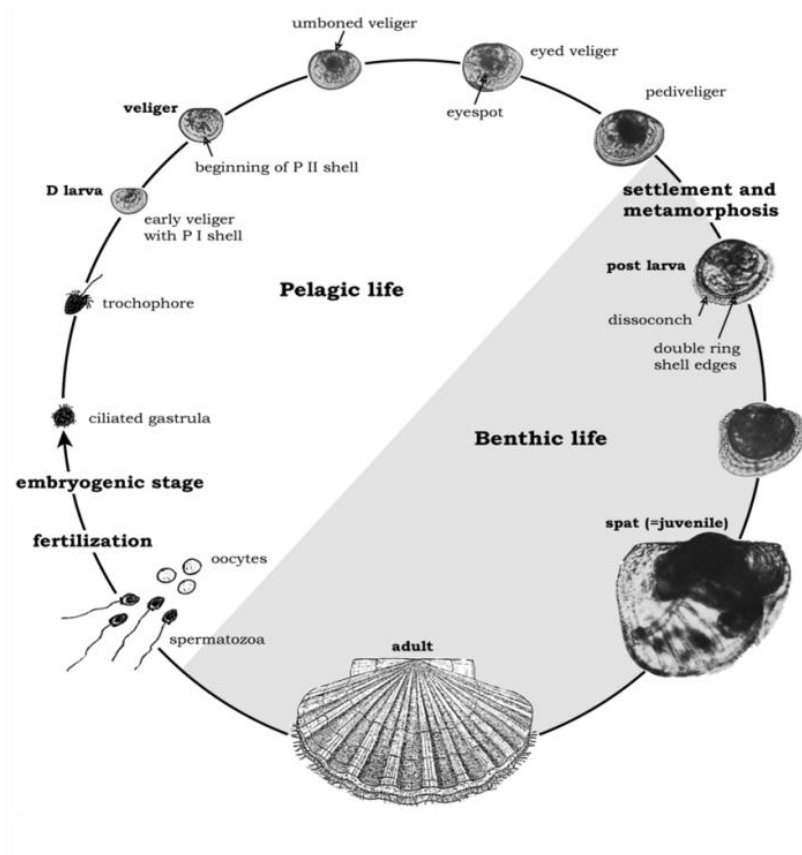


Figura 9: Diagrama del ciclo biológico de *Pecten maximus*. Imagen tomada de Le Pennec, 2003.

1.2.3. Ecología de la vieira: distribución y comportamiento

Hay más de 400 especies de bivalvos en la familia *Pectinidae*, comúnmente conocidas como vieiras. Están presentes en todos los mares del mundo desde las regiones polares hasta los trópicos. La vieira *P. maximus* se distribuye a lo largo de la costa oeste del Atlántico Norte desde el norte de Noruega hasta la península Ibérica (Tebble, 1966), desde donde se extiende por la costa sur de España hacia el Mediterráneo (Cano y García, 1985). También se ha detectado en el

INTRODUCCIÓN

oeste de África, Azores, Islas Canarias y Madeira (Mason, 1983) (Fig.10).

La distribución geográfica depende de muchos factores interrelacionados pero la temperatura es obviamente el factor determinante. Otros factores son la profundidad, el tipo de sustrato, la disponibilidad de nutrientes, salinidad, turbidez, corrientes y la presencia de depredadores o competidores en una determinada distribución local (Brand, 2006).



Figura 10: Distribución geográfica de *Pecten maximus*.

La mayoría de las especies con valor comercial aparecen en las aguas costeras de plataformas continentales aunque las vieiras se pueden encontrar desde la zona intermareal hasta más de 7.000 m. *Pecten maximus* se encuentra justo por debajo de la línea de bajamar hasta los 183 m pero es más común en aguas de 20-45 m de

INTRODUCCIÓN

profundidad en los fondos de arena clara, gravilla o gravilla arenosa, a veces con una mezcla de lodo (Mason, 1983).

Las vieiras son conocidas por su capacidad de nadar, una adaptación inusual en los moluscos bivalvos. Se encuentran normalmente en reposo en depresiones superficiales en el fondo marino, de forma que su valva superior plana está a ras o justo por debajo de la superficie del sedimento (Baird, 1958). Como la mayoría de los pectínidos, *P. maximus* parece tener tres tipos de respuesta frente a las perturbaciones: el cierre de las valvas, un salto que propulsa a la vieira por la zona de la bisagra y una natación vigorosa que la propulsa por el margen ventral. Estos saltos y la natación proporcionan una efectiva vía de escape a los depredadores (Duncan y col., 2016).

1.3. CULTIVO EN CRIADERO

Como ya se ha mencionado, el 16% de la producción acuícola mundial procede del cultivo de moluscos. La captación de semilla en el medio natural provoca que las reservas salvajes presenten signos de sobreexplotación, además de generar grandes variaciones en las cantidades de producto presente en los mercados. Así, el cultivo de moluscos en criaderos proporciona un “respiro” a los bancos naturales de semilla y además, posibilita el aporte constante de bivalvos a los mercados.

1.3.1. Calidad, captación y tratamiento del agua

El primer punto crítico en la construcción de un criadero es la selección de un buen emplazamiento, teniendo en cuenta entre otros factores, las características topográficas del lugar seleccionado, la fácil accesibilidad a una fuente de energía y disponibilidad de una cantidad suficiente de agua de alta calidad. Este último es un requisito

INTRODUCCIÓN

imprescindible para el éxito del criadero, por lo que es fundamental el estudio de la calidad del agua, tanto en superficie como en la columna de agua del lugar de emplazamiento, durante al menos un año. La salinidad y temperatura son dos de los parámetros que sufren más variaciones y la tolerancia a estas fluctuaciones depende de la especie de bivalvo cultivada. Por ejemplo, en vieiras la tolerancia a la baja salinidad es altamente dependiente de la temperatura. Diversos estudios realizados en Noruega recomiendan el emplazamiento de estos criaderos en zonas donde la salinidad no caiga nunca por debajo de 25 o 29 ppt (Strand y col., 1993; Christophersen y Strand, 2003). Otros parámetros a tener en cuenta en la calidad del agua son el pH, turbidez, partículas en suspensión, afloramientos de algas o bacterias que puedan producir sustancias tóxicas para las larvas o la contaminación industrial, agraria o incluso doméstica.

La captación de agua se realiza mediante un sistema de bombeo y tratamiento convenientemente situados cerca del criadero y a suficiente profundidad como para evitar las fluctuaciones tanto en temperatura como en salinidad y afloramientos de plancton. Una vez bombeada, el agua de mar pasa a través de unos filtros de arena que retienen la mayor parte de las partículas en suspensión hacia un tanque de almacenamiento o bien se bombea de forma constante hacia las instalaciones del criadero. Tras este filtrado mecánico, el agua puede someterse a diversos tratamientos para eliminar microorganismos que puedan ser patógenos para los moluscos. La radiación ultravioleta (UV) desnaturaliza el ADN de los microorganismos, causando su muerte o inactivación. Este efecto puede ser temporal o definitivo, dependiendo de los sistemas de reparación y el grado de resistencia a la luz UV que presenta cada bacteria (Joux y col., 1999; Fernández-Zenoff y col., 2006). Además, las bacterias son capaces de protegerse de la radiación ocultas tras partículas de mayor tamaño, por lo que es muy

INTRODUCCIÓN

importante realizar un filtrado previo del agua (Liltved y Cripps, 1999; Hess-Erga y col., 2008). Otro sistema de desinfección del agua es la ozonación. Además de desinfectar, el ozono puede mejorar la calidad del agua al oxidar moléculas orgánicas grandes transformándolas en moléculas más pequeñas y biodegradables, elimina el color del agua al romper moléculas refractarias, oxida los nitritos a nitratos, controla las algas o la turbidez del agua al disminuir el tamaño de las partículas y hace así más fácil su eliminación. El inconveniente es que el ozono resulta tóxico para los moluscos, así que estos sistemas requieren un control exhaustivo de los niveles de ozono en el agua antes de entrar en los tanques del criadero y la eliminación del mismo (Summerfelt, 2003; Attramadal y col., 2012b). En ocasiones estos dos sistemas se combinan ya que la radiación UV elimina los restos de ozono (Sharrer y col., 2007).

Por otro lado, hay que prestar especial atención al nivel de amonio (NH_4^+) que se acumula en el agua que circula por el criadero y que también es tóxico para los moluscos. Este amonio procede directamente de los animales o bien de la amonificación de compuestos nitrogenados orgánicos (restos de alimentos y pseudoheces). Además de eliminarlo del sistema del criadero por su toxicidad para los animales cultivados, también es necesario tratar los efluentes y evitar que esta carga de compuestos nitrogenados acabe en el medio ambiente (Directiva del Consejo Europeo, 1998). Esto se consigue con el uso de biofiltros convenientemente situados en el sistema. En estos, las bacterias que recubren las superficies del filtro realizan la desnitrificación del agua. Este proceso se realiza en dos pasos, un paso inicial de nitrificación en el que bacterias autótrofas oxidan el amonio dando lugar primero a nitrito (NO_2^-) y después a nitrato (NO_3^-) y un paso final de desnitrificación en el que las bacterias heterótrofas

INTRODUCCIÓN

reducen, en ausencia de oxígeno, los nitratos a nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y finalmente, a Nitrógeno gas (N_2) (Fig.11).

En condiciones anóxicas, el amonio también puede ser oxidado mediante un proceso llamado anamox, en el cual bacterias del orden *Planctomycetales* son capaces de convertir este amonio en N_2 utilizando el nitrito como aceptor de electrones (Tal y col., 2006).

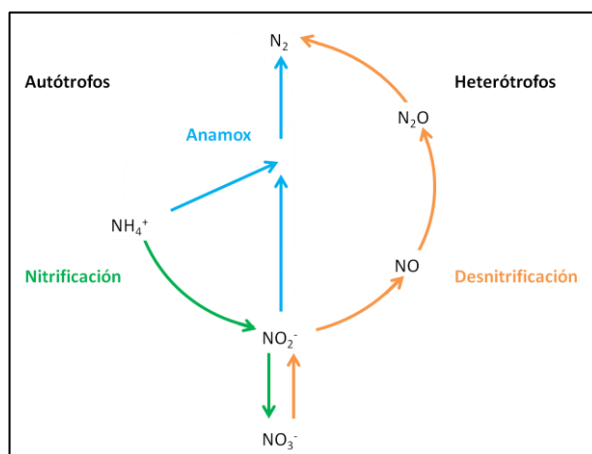


Figura 11: Ciclo del Nitrógeno.

Así, todo el agua entrante en los criaderos es tratada para evitar la introducción de patógenos y enfermedades, así como de sustancias tóxicas (Salvesen y col., 1999; Abasolo-Pacheco y col., 2009). Aunque hay que tener en cuenta que, además de bacterias oportunistas, el agua de mar contiene poblaciones microbianas beneficiosas para el desarrollo de los moluscos actuando como probióticos (Gómez-Gil y col., 2000; Balcázar y col., 2006) o aportando nutrientes a las larvas (Moal y col., 1996). Uno de los métodos empleados para regular la composición microbiana del agua es el uso de agua envejecida, en la que las poblaciones bacterianas presentes están dominadas por no

INTRODUCCIÓN

oportunistas y son más estables y resistentes a las perturbaciones que se producen en el ambiente del criadero, como las oscilaciones en la carga de materia orgánica en el sistema (Vadstein y col., 1993; Skjermo y Vadstein, 1999).

1.3.2. Instalaciones de un criadero

No existe un único esquema para construir un criadero de moluscos, sin embargo, hay una serie de elementos fundamentales interconectados que deben encontrarse en todos ellos. Estos son una zona para mantener y acondicionar a los reproductores e inducir el desove, otra zona de cría y fijación de larvas, la zona de cultivo de juveniles, donde se trasladan las larvas tras la metamorfosis y otra de cultivo de algas para la alimentación de los moluscos. Además, debe haber laboratorios, la estación de bombeo y almacenamiento de agua, sala de máquinas e instalaciones auxiliares como almacén, oficinas, vestuarios, servicios, etc. (Fig.12) (Cuña-Casasbellas, 1991; Helm y Bourne, 2006).

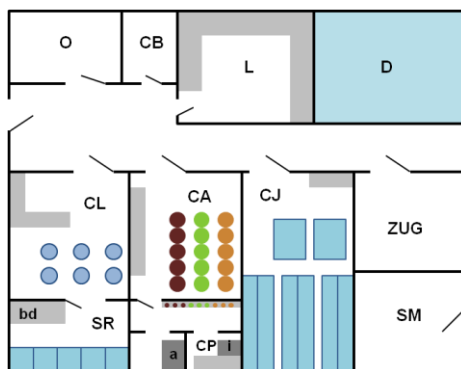


Figura 12: Esquema de las instalaciones de un criadero de bivalvos. O: oficina; CB: cuarto de baño; L: laboratorio; D: depósito de agua; CL: cultivo larvario; SR: sala de reproductores; bd: bandejas de desove; CA: cultivo de algas; a: autoclave; CP: cultivo patrón; i: incubadora; CJ: cultivo de juveniles; ZUG: zona de uso general; SM: sala de máquinas. Imagen adaptada de Helm y Bourne, 2006.

1.3.3. Cultivo de microalgas

La producción de microalgas para la alimentación de bivalvos es un proceso muy importante para el éxito de un criadero. Como las algas se utilizan en todas las fases de producción los cultivos deberían situarse en una zona central y accesible desde toda la planta.

En la sala de cultivo de algas debe haber una zona con un buen aislamiento y temperatura fría constante para el mantenimiento del cultivo patrón (CP) y de botellones de cultivos monoespecíficos en condiciones axénicas. Estas cepas se cultivan en matraces y botellones delante de una batería de lámparas fluorescentes en una sala independiente con un aporte de aire y dióxido de carbono que se mantendrá a unos 15-18 °C. Estos cultivos en botellones se transfieren a los cultivos principales que, normalmente, se realizan en sacos o cilindros altos que reducen la superficie de cultivo utilizada. El agua de mar utilizada para el cultivo inicial se puede filtrar, autoclavar o esterilizar químicamente. Tras esta esterilización se añaden los nutrientes apropiados para las especies que se producen y el cultivo patrón.

Estos esfuerzos en el mantenimiento de las microalgas en condiciones axénicas son fundamentales ya que pueden ser un vector de entrada de microorganismos en los criaderos. Las microalgas están asociadas a diferentes bacterias a través de interacciones que pueden resultar positivas o negativas. Estas bacterias pueden proporcionar un beneficio en el crecimiento de las microalgas al aportar vitaminas y nutrientes o crear las condiciones ambientales favorables para el crecimiento del fitoplancton (Croft y col., 2005; Azam y Malfatti, 2007), aunque también pueden inhibir este crecimiento produciendo sustancias algicidas o compitiendo por nutrientes inorgánicos (Grover, 2000; Sakata y col., 2011). Por otro lado, las microalgas pueden

INTRODUCCIÓN

generar un ambiente favorable para el crecimiento de bacterias al producir sustancias como carbohidratos, productos nitrogenados y vitaminas (Natrah y col., 2014) o sustancias que favorecen la formación de biopelículas (Espeland y col., 2001), pero también pueden tener actividad antibacteriana mediante la producción de sustancias inhibitorias o por la interrupción de la comunicación célula-célula bacteriana (Quorum quenching) entre otros mecanismos (Ribalet, 2008; Natrah y col., 2011; Kokou y col., 2012).

Estas bacterias que se introducen en los tanques de larvas pueden proliferar en ellos e influenciar la microbiota presente ya en el sistema. En algunos estudios se describen los efectos beneficiosos de estas bacterias en el éxito del cultivo de larvas de peces e invertebrados inhibiendo el crecimiento de patógenos oportunistas (Salvesen y col., 1999; Skjermo y Vadstein, 1999; Vandenberghe y col., 1999; Makridis y col., 2006; 2012), aunque en otros se observa el potencial patogénico de estas bacterias en estos cultivos (Nicolas y col., 1989, 2004).

1.3.4. Acondicionamiento de reproductores

El éxito en la producción de larvas en un criadero depende de la disponibilidad de individuos sexualmente maduros y de un correcto acondicionamiento de los mismos para obtener larvas durante un periodo mucho más largo que en condiciones naturales. Este acondicionamiento variará en función de cada especie, por lo tanto, es fundamental el conocimiento de su ciclo reproductor y los factores que influyen en la maduración de la gónada (Fernández-Álvarez y col., 1991). Los reproductores se mantienen en tanques con un circuito abierto de agua de mar, cruda o filtrada y esterilizada con luz UV, que se mantiene a una temperatura constante. Al sistema se conecta una

INTRODUCCIÓN

bomba dosificadora que suministrará el alimento a los reproductores en un volumen constante. Estos tanques deben situarse en una zona tranquila del criadero en la que los bivalvos no sufran perturbaciones y pasen la mayor parte del tiempo alimentándose.

Durante el proceso de acondicionamiento es fundamental el control de la temperatura, el fotoperiodo y la dieta que se aporta a los individuos adultos. La temperatura es uno de los factores ambientales más influyentes en la reproducción de los bivalvos (Sasthy, 1968). Las vieiras (*P. maximus*) en su hábitat natural desovan en un rango de temperatura de 8-15 °C (Strand y Nylund, 1991). El acondicionamiento a temperaturas altas reducirá el tiempo hasta el desove. Estudios realizados en distintas poblaciones de vieira mostraron que las poblaciones acondicionadas a 9 °C llegaron al desove en 11-12 semanas tras el choque térmico, mientras que las que se mantuvieron a 15 °C desovaron 8 semanas después (Utting y Millican, 1998). El fotoperiodo es tan importante como la temperatura en el acondicionamiento de las vieiras. Un incremento en las horas de luz puede suponer el aumento en el número de individuos que desovan. Devauchelle y Mingant (1991) observaron que bajo un régimen de 15 h de luz y 9 h de oscuridad el número de individuos que podían ser inducidos al desove era más del doble que en los acondicionados en periodos de luz más cortos.

La calidad y cantidad de la dieta suministrada a los reproductores tiene una importancia fundamental en el acondicionamiento, ya que debe cubrir los gastos energéticos de la gametogénesis. Los animales ingieren una mezcla de microalgas que se cultivan en las propias instalaciones. Las especies cultivadas más comunes para la alimentación de *P. maximus* son *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans* f. *pumilus*,

INTRODUCCIÓN

Thalassiosira pseudonana, *T. weissflogii*, *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis suecica* (Andersen y col., 2011). Estas especies de microalgas se combinan entre sí para alimentar a los animales en las distintas fases de crecimiento. Así, algunas de las combinaciones son adecuadas para suministrar los ácidos grasos necesarios a los reproductores para la producción de huevos viables y larvas, mientras que otras se utilizan para la alimentación de las larvas durante su desarrollo (Aranda-Burgos y col., 2014).

1.3.5. Desove y manipulación de cigotos

Una vez que los individuos reproductores están maduros se procede a la estimulación de la puesta. Se colocan en bandejas de desove o en los propios tanques de acondicionamiento y se someten a un incremento de temperatura de 5 °C para la inducción del desove, siguiendo los métodos de cría descritos para pectínidos por Gruffydd y Beaumont, (1972).

Pecten maximus es hermafrodita funcional y a pesar de que normalmente hay un tiempo de retardo entre la liberación del esperma y los óvulos, algunos pueden autofecundarse. Con el aumento de la temperatura del agua se produce la liberación inicial de esperma seguida de la de los óvulos, que se produce en 2-4 pulsos. Tras estos pulsos, el animal continuará con la liberación de esperma (Andersen y col., 2011). Hay diferentes estrategias para evitar la autofecundación. En una de ellas se colocan muchos adultos en grandes tanques profundos con circulación de agua continua. Así, los individuos liberan el esperma y este se diluye en el agua. Cuando los individuos comienzan con la liberación de los óvulos, los más densos y pesados se mantienen en el tanque y es el azar el que determina que sean fecundados por esperma propio o de otro ejemplar. Esto se realiza en

INTRODUCCIÓN

instalaciones de producción masiva o en cultivos de bivalvos en estanques (Helm y Bourne, 2006). Otra de las estrategias consiste en separar a los reproductores en distintos recipientes y vigilar el desove. Cuando los animales liberan el esperma se limpian y se cambian a otro recipiente con agua filtrada. Al iniciar la liberación de los óvulos se vuelven a cambiar a otro recipiente limpio. Así, se obtiene el esperma y los óvulos por separado. Estos óvulos se fecundarán con esperma de 3-4 individuos de lotes diferentes en una proporción de 2 ml de esperma por cada litro de suspensión de óvulos y se dejan reposar entre 60 y 90 minutos (Helm y Bourne, 2006).

1.3.6. Cultivo de larvas y semilla

Los huevos fecundados siguen el desarrollo en tanques de fondo plano con agua de mar filtrada mediante diferentes mecanismos físicos y tratada con luz UV. Los embriones permanecerán en el fondo de estos tanques hasta alcanzar la fase de larva veliger D (48 h en el caso de *P. maximus*). En esta fase, las larvas son recuperadas mediante el vaciado del tanque. El agua con las larvas pasa a través de un tamiz en el que quedan retenidas las de mayor tamaño, que se lavan posteriormente con agua de mar filtrada. Las larvas obtenidas son contadas, ya que la densidad del cultivo larvario es fundamental para el desarrollo óptimo del animal. Para estas vieiras la densidad recomendada es de 5.000 a 10.000 larvas por litro de agua. Estas larvas D se colocan en los mismos tanques de fondo plano o bien en tanques cónicos con aireación. Los tanques pueden ser de una gran variedad de formas y tamaños, en función del tamaño de la producción y pueden usarse como sistemas estáticos, en los que todo el agua se cambia periódicamente, sistemas de recirculación en los que se renueva un pequeño porcentaje de agua diariamente, o bien como sistemas abiertos en los que el flujo de agua es continuo. En esta fase

INTRODUCCIÓN

comienzan a alimentarse con cultivos mixtos de microalgas ya que hasta este momento los embriones se estaban alimentando de las reservas del huevo. Las mezclas de dos o más especies de algas proporcionan una mayor tasa de crecimiento (Gruffydd y Beaumont, 1972; Narvarte y Pascual, 2001).

Durante la mayor parte de la fase larvaria las larvas nadan en la columna de agua pero a medida que van creciendo y se acercan al final de la fase larvaria, la actividad se ralentiza, pasan más tiempo en el fondo y consumen menos alimento, lo cual marca el comienzo de la fijación y metamorfosis. Este periodo constituye una etapa crítica en el cultivo de bivalvos en el que se pueden dar grandes mortalidades. Las larvas pediveliger de vieira se transfieren normalmente a tanques de fijación donde se dispone de superficies adecuadas para que las larvas se adhieran segregando el biso. Se han usado una gran cantidad de sustratos artificiales para el asentamiento de las larvas como redes de algodón, marañas de cuerdas de sisal, arbustos de abedul, cuerdas de paja de arroz, ramas de cedro, conchas de vieiras, mosquiteras, polietileno o mallas de nailon entre otros (Cragg, 2006). Estos tanques de fijación pueden estar equipados para agua estática, en recirculación o en flujo continuo.

La metamorfosis es la siguiente etapa, en la que se producen considerables cambios morfológicos y fisiológicos en el animal. No se conocen los factores que la desencadenan aunque el tipo de sustrato y los aspectos físicos, químicos y biológicos indudablemente son importantes. Puede producirse de forma rápida, pero puede retrasarse si no se cumplen las condiciones idóneas. En el criadero a veces se puede retrasar si se reduce la temperatura del agua.

Las tasas de supervivencia posteriores a la fijación en la vieira normalmente no son muy altas; se considera normal de 15 a 30% del número inicial de larvas pediveliger hasta 2 mm de altura de concha.

1.3.7. Control de microorganismos en el criadero y buenas prácticas

La infraestructura necesaria para la producción de moluscos en criadero consiste en un amplio surtido de componentes sumergidos que sirven de superficie para la adherencia de numerosos microorganismos formando biopelículas. Los protocolos seguidos tradicionalmente en los criaderos tratan de evitar esta colonización bacteriana en las instalaciones desinfectando los reproductores, las superficies de tanques o cambiando frecuentemente los filtros, además del uso de antibióticos como medida preventiva ya que en estas biopelículas se pueden encontrar bacterias patógenas oportunistas que podrían provocar, al igual que ha ocurrido en cultivos de peces y crustáceos, la pérdida de la producción (Magariños y col., 1994; Karunasagar y col., 1996; King y col., 2004; Prado, 2006) además de competir por los recursos y el espacio con las especies cultivadas. Sin embargo, el objetivo actual es el de intentar establecer y mantener una biopelícula que mantenga el equilibrio de las poblaciones microbianas en el sistema (Qian y col., 2007), ya que, como se ha mencionado anteriormente, en las biopelículas también están presentes bacterias que influyen en la fijación de las larvas (Holmström y col., 1992; Maki y col., 1992; Encomendero y Dupré, 2003; Lau y col., 2005; Li y col., 2006; Leyton y Riquelme, 2008), bacterias con actividad antimicrobiana o que impiden la adherencia de algas (Holmström y col., 2002; Dobretsov y col., 2006). Además, estas bacterias sirven de suplemento nutricional para las larvas (Moal y col., 1996) y constituyen una especie

de filtro biológico natural para eliminar productos metabólicos como el amonio y los nitritos del sistema (Qian y col., 2007).

1.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

El tipo de cultivo más comúnmente utilizado en la producción de moluscos bivalvos en criadero es el cultivo estático, en el que los animales se introducen en tanques en los que se realiza un cambio de todo el agua 3 o 4 veces por semana y se añade comida una o dos veces al día (Andersen y col., 2000; Torkildsen y Magnesen, 2004). Esto se traduce en picos de materia orgánica y un ambiente microbiológico inestable que se controla, normalmente, con el uso profiláctico de agentes antibacterianos añadidos en cada cambio de agua. Un antibiótico de uso común era el cloranfenicol, cuya utilización en animales destinados al consumo humano se prohibió en la Unión Europea en 1994 (Reglamento (CE) N° 1430/94). Además, debido a la renovación del agua de tanque y la limpieza de los mismos en cada cambio, el coste laboral es alto. Esto propició que se buscasen métodos alternativos de cultivo, con el fin de minimizar el uso de tratamientos profilácticos y los gastos de producción, así como mejorar la supervivencia larvaria y post-larvaria tratando de maximizar el crecimiento y el éxito en la metamorfosis.

1.4.1. Flujo continuo (FTS)

Los sistemas de flujo continuo o abierto, FTS (por sus siglas en inglés *Flow-Through Systems*), se basan en el paso continuo de agua, previamente filtrada y a la temperatura deseada, a través de las instalaciones del criadero (Fig.13). Las microalgas se añaden de forma constante con la concentración adecuada y los residuos orgánicos también se eliminan de forma continua, por lo que los pulsos de materia orgánica que se producen en los sistemas estáticos desaparecen y con

INTRODUCCIÓN

ellos, la necesidad de añadir un tratamiento profiláctico. El manejo de las larvas se minimiza disminuyendo el estrés y el coste laboral asociado. Por el contrario, el gasto de agua y energía es muy elevado.

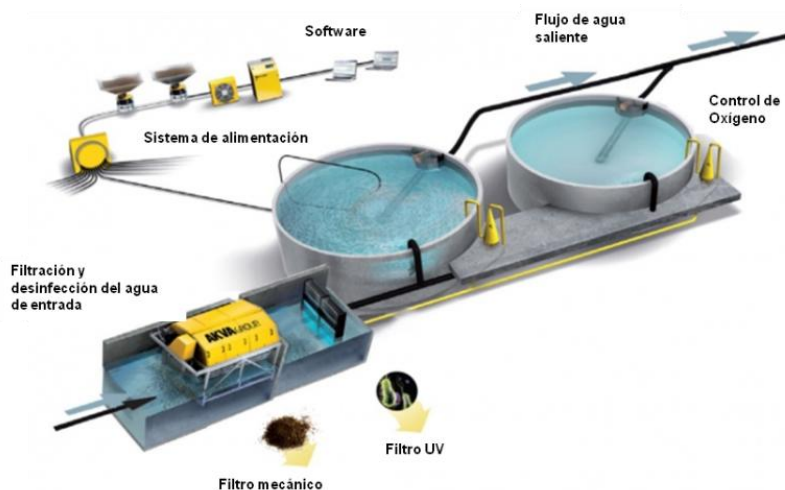


Figura 13: Diagrama de un sistema de flujo continuo (FTS). Fuente: AKVA Group.

Cuando se desarrollaron los cultivos de larvas de peces marinos estos sistemas de flujo continuo mostraron muy buenos resultados (Harboe y col., 1994) por lo que, en 1999 se probaron en el cultivo de larvas de vieira con similares resultados (Andersen y col., 2000). Desde entonces, el desarrollo y mejora de este sistema de cultivo ha sido uno de los principales objetivos en los cultivos de *P. maximus* en Noruega (Andersen y col., 2000; Bergh y Strand, 2001; Torkildsen y Magnesen, 2004; Magnesen y col., 2006, 2013).

1.4.2. Recirculación (RAS)

Los sistemas de producción de recirculación de agua, RAS (por sus siglas en inglés *Recirculation Aquaculture System*), consisten en la reutilización constante del agua gracias al tratamiento de la misma mediante filtros mecánicos y biológicos (Fig.14). En estos sistemas la renovación de agua diaria se puede reducir a un 5-10% de la cantidad total. Tienen por objetivo reducir las necesidades de agua y las emisiones de nutrientes al medio. Como principales ventajas de este sistema destaca el ahorro de agua y energía, el riguroso control de la calidad de agua, su bajo impacto ambiental, los altos niveles de bioseguridad y la facilidad en el control de los residuos en comparación con otros sistemas de producción. Además, se obtiene una mayor cantidad de producto en menos espacio y con menos trabajadores que en cualquier otro sistema sin estar sometido a las condiciones estacionales (Timmons y Ebeling, 2007). Como inconvenientes hay que destacar los elevados costes iniciales, la necesidad de realizar una gestión de explotación muy cuidadosa con mano de obra altamente cualificada y las dificultades encontradas en el tratamiento de las enfermedades.

Un sistema de recirculación es un ambiente complejo en el que la microbiología se ve afectada por el régimen y tipo de comida utilizada, las rutinas de manejo, la microbiota asociada a los animales en producción (Sugita y col., 2005), los parámetros de calidad de agua (Schreier y col., 2010) y la presión selectiva de los biofiltros (Attramadal y col., 2012a). Normalmente, la cantidad de amonio y nitritos en los sistemas de producción clásicos no se encuentran en valores críticos, sin embargo, en los sistemas de recirculación, la acumulación de estos compuestos puede alcanzar niveles de toxicidad para los animales cultivados (Davidson y col., 2011). El reto de los biofiltros es conseguir

INTRODUCCIÓN

la transformación total del amonio coordinando eficazmente la nitrificación aerobia con la desnitrificación anaerobia en un mismo ambiente y todo ello haciéndolo más accesible a los productores y mejorando la relación coste-efectividad (Bentzon-Tilia y col., 2016).

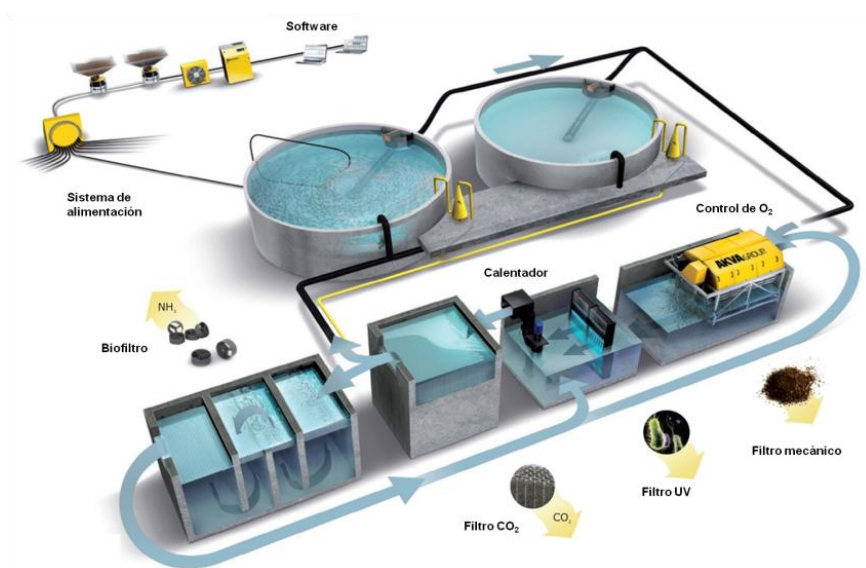


Figura 14: Diagrama de un sistema de recirculación (RAS). Fuente: AKVA Group.

Estos sistemas están poco implantados en Europa y la mayoría de ellos están dedicados al cultivo de peces, aunque se han realizado algunos estudios en moluscos, todos ellos con carácter experimental (Pfeiffer y Rusch, 2000; Christophersen y col., 2006; Blanco-García y Kamermans, 2015). En el marco del proyecto europeo REPROSEED, distintos grupos implantaron planes piloto de cultivo en recirculación (RAS) y flujo continuo (FTS) de distintas especies de moluscos bivalvos: ostras (*Crassostrea gigas*) en Francia, mejillones (*Mytilus edulis*) en Holanda, almejas (*Ruditapes decussatus*) en Portugal y vieiras (*P. maximus*) en Noruega. Kamermans y col. (2016), realizaron

INTRODUCCIÓN

una comparativa de los resultados obtenidos por los distintos investigadores y comprobaron que el sistema RAS muestra resultados similares a los encontrados en los sistemas FTS en cuanto a supervivencia y crecimiento de las distintas especies, por lo que concluyen que es una buena alternativa de cría.

1.5. MICROBIOTA ASOCIADA A MOLUSCOS

En los animales marinos existen dos tipos de microbiota, la microbiota transitoria, presente de forma temporal en el organismo, y la microbiota residente, que está presente de forma permanente y estable en el huésped. Algunos autores mantienen que no existe una microbiota residente en moluscos ya que esta cambia con la ingesta y el ambiente de forma rápida, sin tener tiempo de establecerse (Jorquera y col., 2001), mientras que otros estudios han detectado la presencia de una microbiota propia y estable en moluscos bivalvos junto con bacterias procedentes del ambiente o de una transmisión parental (Harris, 1993; Riquelme y col., 1994; Skerjmo y Vadstein, 1999; Sandaa y col., 2003; Godoy y col., 2011). En ambos casos, el conocimiento de la microbiota asociada a los moluscos es fundamental para conocer el estatus sanitario de los mismos y optimizar las condiciones de cultivo de estos animales en ambientes artificiales, intentando igualar o incluso mejorar las condiciones en las que se encuentran en el ambiente marino. A pesar de esto, la mayoría de estudios realizados en microbiología de moluscos bivalvos están centrados básicamente en la detección de patógenos o incluso de bacterias beneficiosas, pero son escasos los análisis que se dirigen al estudio de la biodiversidad asociada a estos animales y el ambiente que los rodea, así como las interacciones que se producen entre ellos (Avendaño-Herrera y col., 2001; Schulze y col., 2006; Garnier y col.,

INTRODUCCIÓN

2007; Beaz-Hidalgo y col., 2010a; Romalde y col., 2010, 2013, 2014; Desriac y col., 2014; Jasmin y col., 2016; Dubert y col., 2017).

Los estudios iniciales en microbiota de moluscos se basaron en la identificación fenotípica de microorganismos cultivables. En 1960, Colwell y Liston realizaron un estudio de la microbiota asociada a ostras (*C. gigas*) de poblaciones naturales en distintas zonas de Washington. Establecieron que *Pseudomonas* y *Vibrio* eran los géneros más abundantes, seguidos de *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* y *Bacillus*. Murchelano y su equipo llevaron a cabo un estudio posterior en individuos adultos y juveniles de ostra americana (*C. virginica*) (Murchelano y Brown, 1968; Murchelano y Bishop, 1969). En ambos trabajos encontraron los mismos géneros que ya habían descrito Colwell y Liston, con excepción de las bacterias Gram-positivas. Los individuos adultos presentaban una microbiota formada por *Pseudomonas*, *Flavobacterium*/*Cytophaga*, *Vibrio* y *Achromobacter*/*Alcaligenes*, mientras que en los individuos juveniles detectaban una microbiota más diversa, con *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus*, aunque los géneros mayoritarios seguían siendo *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* y *Achromobacter*.

En un estudio realizado por Sugita y col. (1981) en distintas especies de almeja, mejillón y ostra, se identificaron los grupos mayoritarios de bacterias presentes como *Vibrio*/*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella* y *Micrococcus*, los cuales también aparecían en proporción similar en los sedimentos y agua analizados. Por ello, determinaron que la microbiota de los moluscos está fuertemente influenciada por la del ambiente que los rodea.

INTRODUCCIÓN

Un estudio comparativo similar llevado a cabo en ostras (*C. gigas*), almejas (*Anadara (Scapharca) cornea*) y mejillón (*Perna viridis*) por Kueh y Chan (1985) mostró que *Pseudomonas* era el género mayoritario presente en los moluscos y agua, seguido por *Vibrio*, *Acinetobacter* y organismos coliformes, además de *Flavobacterium/Cytophaga* y Coryneformes. Estos autores, al igual que lo sugerido en trabajos anteriores, apoyaron que las poblaciones encontradas en los moluscos son un reflejo de aquellas que se encuentran en el agua.

Riquelme y colaboradores (1994) realizaron un análisis de la microbiota asociada a la gónada de individuos adultos de *Argopecten purpuratus*. Las bacterias mayoritarias encontradas en estos órganos correspondieron con representantes de los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*, seguidos por *Moraxella*, *Flavobacterium* y *Chromobacterium*. Además, en este estudio demostraron la presencia de un mayor número de bacterias en los óvulos que en el esperma y la transmisión vertical de bacterias desde los reproductores, apoyando los estudios realizados por Lodeiros y col. en 1987 en ejemplares de ostra plana (*Ostrea edulis*). Estos resultados fueron confirmados en un estudio similar realizado por los mismos autores al año siguiente, en el que los géneros *Acinetobacter* y *Cytophaga* se incorporaban a la lista de bacterias presentes en las gónadas capaces de transmitirse a las larvas (Riquelme y col., 1995).

Pujalte y col. (1999), estudiaron la microbiota presente en ostras (*O. edulis*) y agua del Mediterráneo durante un año. Los resultados demostraron que *Vibrio* es el género más frecuente en ostras y agua en los meses cálidos, mientras que un grupo de α -*Proteobacterias* no identificadas lo son en los meses fríos. Además, encontraron otros géneros formando parte de la comunidad microbiana presente en los

INTRODUCCIÓN

moluscos, como *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Halomonas*, *Photobacterium*, *Marinomonas*, *Alteromonas*, *Bacillus* o *Cytophaga/Flavobacterium*.

Por otro lado, Beleneva y col. (2003), compararon la microbiota asociada a mejillones cultivados y en poblaciones naturales (*Mytilus trossulus*) junto con las comunidades presentes en el agua de mar mediante la caracterización fenotípica y el análisis de la composición de ácidos grasos. Los ejemplares cultivados presentaron una mayor carga bacteriana, aunque los géneros que forman parte de la microbiota de ambas poblaciones de moluscos eran los mismos. Estas poblaciones estaban formadas por distintos géneros de *Enterobacteriaceae*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Moraxella*, *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*, *Deleya*, *Bacillus*, *Micrococcus* y *Streptomyces*.

Cavallo y col. (2009), realizaron un estudio similar analizando la microbiota cultivable presente en mejillones (*M. galloprovincialis*) y agua. Encontraron una mayor densidad bacteriana en los mejillones pero la diversidad presente en los moluscos y en las muestras de agua fue similar. La microbiota de los mejillones estaba formada por bacterias identificadas como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *Lucibacterium*.

Durante años nuestro grupo de investigación se ha centrado en el análisis de la microbiota cultivable asociada a almejas cultivadas (*R. philippinarum* y *R. decussatus*) en Galicia (Romalde y col., 2013). En los distintos proyectos llevados a cabo, se aislaron numerosos representantes del género *Vibrio*, constituyendo el taxón más abundante de la microbiota de estos bivalvos (Beaz-Hidalgo y col.,

INTRODUCCIÓN

2008). Además, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Tenacibaculum*, *Psychrobacter*, *Alteromonas*, *Polaribacter*, *Luteimonas*, *Marinomonas*, *Lacinutrix*, *Cobetia*, *Nesterenkonia* o *Arthrobacter* son otros de los géneros que se detectaron formando parte de la microbiota normal de almejas.

A pesar de que la diversidad bacteriana detectada en los últimos estudios ha aumentado se estima que las técnicas tradicionales de cultivo utilizadas en todos ellos sólo permiten detectar entre un 0,01 y el 1% de la diversidad bacteriana existente (Amann y col., 1995; Green y Keller, 2006). Por lo que el desarrollo del análisis con métodos no dependientes de cultivo es fundamental para el conocimiento de la microbiota total de moluscos.

Zurel y col. (2011) compararon mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr, la microbiota de las branquias de dos especies de ostras, una de ellas invasora en el Mediterráneo. Las comunidades presentes en las branquias de las ostras son diferentes a las que encuentran en el agua, por lo que representan poblaciones microbianas autóctonas (microbiota residente). Además, la microbiota presente en ambas especies en distintas localizaciones geográficas es similar. El grupo mayoritario en todas las muestras es el filo *Proteobacteria*, especialmente γ -*Proteobacteria*, dentro de las cuales destacan las *Oceanospirillales*.

En otro trabajo, Lokmer y col. (2016) estudiaron la microbiota asociada a diferentes tejidos de ostras (*C. gigas*) y el agua de mar en diferentes localizaciones utilizando técnicas de pirosecuenciación. Comprobaron que la riqueza total era mayor en las muestras de agua, sin embargo la riqueza relativa lo era en ostras, principalmente en la familia *Vibrionaceae*. Las comunidades más abundantes en agua (α -

INTRODUCCIÓN

Proteobacteria y *Flavobacteriaceae*) también se encontraban en las ostras, especialmente en la hemolinfa, aunque en menor abundancia. Comparando los tejidos, la hemolinfa posee una comunidad bacteriana distinta compuesta principalmente por ϵ -*Proteobacteria* (*Arcobacter*), *Flavobacteria*, *Fusobacteria* (*Psychriliobacter*) y γ -*Proteobacteria* (*Oceanospirillaceae* y *Vibrionaceae*). En menor medida, también encontraron *Spirochaetes* (*Brachyspirae*) y β -*Proteobacteria*. Entre los tejidos la mayor diferencia fue la alta abundancia de *Mollicutes* en intestino. La diversidad encontrada en las ostras, la correlación entre los vibrios cultivables y la riqueza específica dentro del tejido, junto con la similitud entre las comunidades microbianas encontradas en la hemolinfa y el agua, permitió a los autores proponer que la hemolinfa no es sólo un reflejo de la microbiota del agua sino que también es la vía de entrada para *Vibrio*, que puede dispersarse por los tejidos sólidos y crear una infección sistémica.

Parece evidente que la microbiota asociada a los moluscos está influenciada por diversos factores como la dieta, el hábitat y las condiciones ambientales o la fase de desarrollo del animal entre otros, por lo que son necesarios estudios que integren el análisis de las comunidades asociadas a los moluscos y su ambiente.

1.5.1. Microbiota asociada a moluscos en criadero

Los criaderos contienen diversas comunidades microbianas entre las que se encuentran bacterias patógenas, inocuas y beneficiosas y la habilidad para mantener un balance adecuado entre estas poblaciones es fundamental para el correcto desarrollo del cultivo (Schulze y col., 2006). La práctica habitual en el criadero de moluscos es la de eliminar todas las poblaciones microbianas a través del uso de filtros, ozono y luz UV o desinfección de superficies de tanques entre

INTRODUCCIÓN

otras medidas de prevención, pero la introducción de microorganismos a través de la alimentación, el agua de entrada o incluso la transmisión vertical desde los reproductores es inevitable (Riquelme y col., 1994; Holmström y Kjelleberg, 1999; Sandaa y col., 2003). En los últimos años, y con el avance de las técnicas de detección e identificación, el conocimiento de la diversidad bacteriana presente en los moluscos ha aumentado en gran medida, aunque el papel que juegan estos microorganismos en los hospedadores no se ha definido. Se han sugerido una serie de efectos beneficiosos asociados a la microbiota de un organismo como el desarrollo del aparato digestivo del hospedador, la nutrición ya que proporcionan vitaminas, ácidos grasos esenciales y enzimas, o la protección frente a diversos patógenos, entre otros. Por ejemplo, se ha asociado a las Proteobacterias con la digestión de celulosa y agar, principales componentes de los alimentos que consumen los moluscos bivalvos. Además, algunas especies son capaces de fijar Nitrógeno en el tracto intestinal de los bivalvos (Trabal y col., 2014). Según el concepto holobionte (Zilber-Rosenberg y Rosenberg, 2008), el papel de la microbiota en los organismos podría ser fundamental en la ontogénesis y el posterior desarrollo de los mismos. Por lo tanto, como las poblaciones microbianas presentes en los organismos, en nuestro caso los moluscos bivalvos, pueden ser responsables de la salud de los mismos, la microbiota que se establece en los criaderos podría ser un factor clave en el éxito de la producción, por lo que su conocimiento y capacidad de modificación y optimización serían fundamentales. A pesar de ello, los estudios que se centran en identificar estas poblaciones microbianas son escasos.

Sandaa y colaboradores (2003) utilizaron la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante, DGGE (por sus siglas en inglés, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), para analizar las poblaciones bacterianas asociadas con las larvas de *P.*

INTRODUCCIÓN

maximus de un criadero noruego. Los grupos predominantes en las poblaciones larvarias fueron *γ-Proteobacteria*, *α-Proteobacteria* y *Cytophaga-Flexibacter*, pero no consiguieron una identificación más precisa excepto en dos aislados de *γ-Proteobacteria* clasificados como *Pseudoalteromonas* sp.

En otro estudio, Godoy y colaboradores (2011), realizaron un análisis comparativo de las bacterias cultivables asociadas a larvas de ostión chileno *Argopecten purpuratus* tratadas y sin tratar con tetraciclina. Los géneros *Alteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacter* y *Pseudomonas* eran comunes a ambas larvas, mientras que las larvas sin tratamiento con antibiótico también presentaban bacterias identificadas como *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum*, *Vibrio* y *Rhodobacteraceae*. En cualquier caso, las larvas presentaron una mayor diversidad bacteriana que el agua y las microalgas también analizadas.

Por otro lado, Trabal y col. (2012), realizaron un estudio comparativo de la microbiota de dos especies de ostras (*C. gigas* y *C. corteziensis*) en fases de desarrollo diferentes: postlarva en criadero y juveniles y adultos en dos áreas de cultivo distintas. Además, estudiaron los cambios en la composición microbiana de las post-larvas implantadas en dos lugares diferentes. Para ello utilizaron las técnicas de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción, RFLP (por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), secuenciación del gen 16S ARNr y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura, TGGE (por sus siglas en inglés *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*). Durante la fase de postlarva en criadero, ambas especies presentaron una composición microbiana uniforme. Esto puede deberse a que en el criadero son alimentadas de igual forma y, las bacterias asociadas a las microalgas influyen de la

INTRODUCCIÓN

misma manera a la microbiota presente en las larvas. En las fases posteriores observaron que *C. gigas* presentaba una mayor diversidad bacteriana en ambos lugares de cultivo, lo cual justificaron con la mayor capacidad de filtración que presenta esta especie de ostra con respecto a *C. corteziensis*. Aunque presentaban diferencias en diversidad también se encontraron bacterias comunes a ambas especies en las dos áreas. Estas bacterias pertenecían a los géneros *Burkholderia* y *Bacillus*. A pesar de que la presencia de *Pseudomonas* y *Vibrio* es habitual en la microbiota de moluscos, en este estudio no se detectaron. Este hecho puede deberse a que utilizaron ostras depuradas. Estos mismos autores en 2014 (Trabal y col., 2014), utilizaron técnicas de pirosecuenciación para determinar la microbiota asociada a las mismas especies de ostras, además de *C. sikamea*, en dos localizaciones durante un ciclo comercial de producción. Gracias al uso de estas técnicas se incrementa de manera extraordinaria la diversidad detectada, por lo que identificaron géneros bacterianos que nunca habían sido asociados con moluscos. Las muestras presentaron como comunidades dominantes los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, en este orden y comprobaron que la microbiota durante la fase de postlarva presentaba una composición bacteriana uniforme que era independiente del hospedador, debido probablemente a que las larvas se criaban en el mismo criadero y las mismas condiciones. En los individuos adultos de *C. corteziensis* y *C. sikamea* encontraron comunidades microbianas similares cuando se cultivaban en el mismo lugar, por lo que las diferentes condiciones medioambientales juegan un papel fundamental en la microbiota de los organismos. Los adultos de *C. gigas* no mostraron el mismo comportamiento, sino que presentaron diferencias intraespecíficas en las poblaciones bacterianas. Aún así, encontraron diversos géneros fuertemente asociados a las tres especies de ostra. Estos géneros son

INTRODUCCIÓN

Burkholderia y *Escherichia/Shigella*, que se encuentran en todas las fases de desarrollo de estos moluscos y en ambos sitios de cultivo, lo cual sugiere que podrían ser parte de la microbiota residente de estos animales.

Analizando estos resultados por géneros, los pertenecientes a *Proteobacteria* detectados fueron *Neptuniibacter*, *Marinicella*, *Oceanicola*, *Escherichia/Shigella*, *Rhodovulum*, *Cycloclasticus*, *Thalassomonas*, *Burkholderia*, *Cohaesibacter*, *Pseudolateromonas*, *Roseovarius*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Maritalea*, *Kiloniella*, *Reinekea*, *Methylophaga*, *Alteromonas*, *Desulfoluna*, *Sneathiella* y *Kordiimonas*. Los *Bacteroidetes* estaban representados en las postlarvas por los géneros *Aquimarina*, *Crocinitomix*, *Ekhidna*, *Gilvibacter*, *Jejuia*, *Kordia*, *Lewinella*, *Marinifillum*, *Muricauda*, *Reichenbachella*, *Robiginitalea*, *Roseivirga*, *Salinimicrobium*, *Sediminibacterium*, *Tenacibaculum*, *Wautersiella* y *Winogradskyella*. El filo *Actinobacteria* está presente sólo con el género *Propionibacterium* en larvas y adultos y podría proceder de una contaminación tras la manipulación de las ostras por los operarios. Los filos *Firmicutes*, *Fusobacterium* y *Spirochaetes* están presentes, pero con una representación muy baja.

En un estudio recientemente publicado, Lasa y col. (2016) analizaron, mediante la técnica de pirosecuenciación, la microbiota asociada a la gónada de reproductores de vieira (*P. maximus*) diferenciando la porción femenina y masculina antes y después de la puesta. Los resultados muestran que la gónada es un órgano que presenta una amplia diversidad bacteriana y en todas las muestras, el filo *Proteobacteria* es el más abundante, representado por β - y γ -*Proteobacteria*, en contraste con estudios anteriores en los que la clase α -*Proteobacteria* era la mayoritaria en muestras de moluscos (Sandaa y

INTRODUCCIÓN

col., 2003; Trabal y col., 2014). Estas diferencias pueden deberse a que en estos estudios se analizan los animales completos, mientras que Lasa y colaboradores se centran en las gónadas exclusivamente. La misma razón podría explicar la ausencia de vibrios en las muestras y la escasa presencia de representantes del género *Pseudoalteromonas*, ambos miembros habituales de la microbiota de moluscos y de ambientes marinos. Además de Proteobacterias, se encuentran bacterias asignadas a los filos *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* como grupos mayoritarios en las muestras.

Asmani y colaboradores (2016) analizaron la microbiota asociada a larvas de *C. gigas* en dos sistemas de cultivo, un sistema abierto (FTS) y un sistema de recirculación sin renovación de agua (RAS-0) y con el 25% de renovación de agua (RAS-25), analizando además las comunidades presentes en el agua, el biofiltro y las algas. Encontraron que las poblaciones bacterianas eran diferentes en agua, larvas, biofiltro y algas, de hecho llama la atención la especificidad de las comunidades que llegan a establecerse en el agua y las larvas en cualquier sistema y tiempo de cría. La abundancia relativa de los diferentes grupos taxonómicos cambia de un nicho a otro. Las proteobacterias se encuentran en un 45% en el agua, 89% en larvas y 74% en el biofiltro. Las α -*Proteobacteria*, incluyendo numerosas *Rhodobacteriaceae*, alcanzan el 50% en las larvas y el biofiltro, mientras que en el agua no llegan al 24%. Las β -*Proteobacteria* constituyen la mayor parte de la microbiota de las larvas, aunque fueron insignificantes en el resto de muestras. El filo *Bacteroidetes*, principalmente *Flavobacteriia*, estaba representado en las muestras de agua aunque en niveles muy bajos en otras muestras. Las bacterias no clasificadas constituyen un 40% de la población en agua, un 18% en las muestras de algas y menos de un 2% en larvas y biofiltro. Una parte

sustancial de la microbiota presente en las larvas está ausente de algas y agua, por lo que se le supone una procedencia desde los reproductores.

1.5.2. Microorganismos perjudiciales

Debido a su alimentación filtradora, los moluscos son capaces de bioacumular en sus tejidos parásitos, virus o bacterias presentes en el agua y transmitirlos al ser humano u otros vertebrados superiores a través del consumo de estos animales en crudo o poco cocinados. Generalmente, estos microorganismos no provocan enfermedades en los moluscos, aunque algunos de ellos son conocidos patógenos de los mismos y causantes de altas mortalidades en poblaciones de moluscos bivalvos tanto naturales como en cultivo.

Los cultivos larvarios son sistemas complejos que se ven afectados por un amplio número de factores ambientales. La temperatura, la salinidad, el volumen y la densidad de cultivo, el flujo y la circulación del agua, la calidad y cantidad de alimento o la luz son factores que afectan al crecimiento y supervivencia de las larvas. Un aumento en la temperatura del agua, el hacinamiento de los reproductores, la acumulación de detrito o cambios rápidos en la calidad del agua (pH, turbidez...), entre otras alteraciones, se relacionan con el aumento del estrés al que es sometido el animal y son un claro detonante para el crecimiento masivo de bacterias. Las enfermedades de bivalvos tienen lugar principalmente durante la fase larvaria y son un punto limitante en el cultivo de estos moluscos (Elston y Leibovitz, 1980; Nicolas y col., 1996; Riquelme y col., 1995, 1996a).

1.5.2.1. Parásitos

Los parásitos son patógenos comunes de muchos moluscos. Entre los más relevantes se encuentran representantes de los géneros *Perkinsus*, *Marteilia*, *Haplosporidium* y *Bonamia*. Todos ellos han sido los responsables de importantes episodios de mortalidad en distintas especies de moluscos, como las causadas por *Perkinsus* en orejas de mar en Australia, ostras en el Golfo de México o almejas en Portugal (Lester y Davis, 1981; Azevedo, 1989; Ray, 1996), por *Marteilia* en ostras en Australia o berberechos en Galicia (Green y col., 2011; Carrasco y col., 2013), por *Haplosporidium* en ostras en EEUU y en Galicia (Azevedo, 1999; Burrenson y Stokes, 2000) o por *Bonamia* en ostras en España y Nueva Zelanda (Carrasco y col., 2012; Lane y col., 2016).

A pesar de este amplio abanico de especies hospedadoras, ninguno de estos parásitos han sido detectados en vieiras del género *Pecten*. De hecho, son pocos los parásitos identificados como patógenos de las mismas. Léger y Duboscq, en 1917, describieron la especie de parásito *Pseudoklossia pectinis* que aislaron de individuos de *P. maximus*. Desde este trabajo, no se han detectado más parásitos en vieiras del género *Pecten* y pocos han sido los estudios realizados en este terreno, excepto el llevado a cabo, casi un siglo después por Kristmundsson y col., (2011) en distintas poblaciones de pectínidos europeos, que tuvo como resultado la descripción de un nuevo parásito del filo *Apicomplexa*, *Margolisiella islandica*.

1.5.2.2. Virus

A pesar de que se han descrito en la literatura numerosos episodios de mortalidad de cultivos de moluscos debidos a distintas

INTRODUCCIÓN

familias de virus, la falta de líneas celulares apropiadas para el cultivo de los mismos ha provocado que las descripciones sean meramente estructurales y estos virus estén poco caracterizados. Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación, cada vez son más los genomas virales obtenidos y por lo tanto, la información de cada uno de ellos se amplía (Arzul y col., 2017). Se han detectado virus pertenecientes a las familias *Herpesviridae*, *Birnaviridae*, *Papovaviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae* o *Picornaviridae* en diferentes especies de moluscos (Renault y Novoa, 2004), pero han sido pocas las mortalidades de vieiras del género *Pecten* ocasionadas por estos organismos. En 1987, se produjo un episodio de mortalidad masiva en individuos adultos y semilla de *P. maximus* en un criadero en Noruega. Mortensen y col. (1990) aislaron de hepatopáncreas el serotipo N1 del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, IPNV (por sus siglas del inglés *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*). Este virus es un conocido patógeno de peces, perteneciente a la familia *Birnaviridae*, pero su papel como patógeno de moluscos bivalvos no está claro. Estudios posteriores realizados por este mismo grupo, determinaron que las vieiras eran capaces de inactivar y eliminar este virus rápidamente, por lo que no se pudo relacionar la mortalidad de estos animales con este virus aunque sí se concluyó que actuaban como un vector de transmisión y reservorio de IPNV en ambientes naturales (Mortensen y col., 1992).

Otro virus fue detectado por Hine y Wesney (1997), asociado a mortalidades en Nueva Zelanda de individuos adultos de *Pecten novaezelandiae*. Estos presentaban necrosis de las células epiteliales de la glándula digestiva y el estudio con microscopía electrónica reveló la presencia de partículas virales. Aunque no fue posible la identificación del virus, el tipo de ácido ribonucleico y la asociación del

INTRODUCCIÓN

mismo con el retículo endoplasmático sugería un virus tipo enterovirus o calicivirus.

Por último, en el año 2000 se produjo una mortalidad masiva de larvas de *P. maximus* en un criadero en Francia. Arzul y col. (2001) demostraron que estas mortalidades habían sido causadas por el Herpesvirus de la ostra, concretamente OsHV-1 (del inglés: *Ostreid Herpesvirus-1*). Este virus se habría transmitido horizontalmente desde cultivos de ostra también presentes en el mismo criadero y verticalmente desde las vieiras adultas asintomáticas hasta las larvas, causando lesiones celulares e incluso la lisis celular.

1.5.2.3. Bacterias

a) Bacterias patógenas de larvas de moluscos

Aunque, como ya se ha mencionado, las infecciones de moluscos pueden deberse a virus, parásitos u hongos (no tratados en esta memoria), las bacterias son los principales agentes causales de mortalidades masivas en criaderos de bivalvos (Nicolas y col., 1996). Pueden entrar en los cultivos a través del agua, aire, reproductores o cultivos de microalgas en los cuales proliferan debido a la alta concentración de nutrientes que favorecen el crecimiento de las bacterias (Sainz-Hernández y col., 2005). Además, la mala calidad del agua, la alta densidad de larvas o el exceso de alimentación favorece la aparición de patógenos oportunistas causantes de muchos de los episodios de mortalidad en criaderos (Di Salvo y col., 1978; Robert y col., 1996).

El género *Vibrio* es habitual en ambientes acuáticos y forma parte frecuentemente de la microbiota de moluscos. Este género incluye conocidos patógenos de bivalvos que llegan a causar las

INTRODUCCIÓN

pérdidas totales de la producción en criaderos, afectando a todas las etapas de desarrollo de distintas especies de moluscos (Beaz-Hidalgo y col., 2010a; Travers y col., 2015). La vibriosis fue descrita por primera vez por Guillard (1959), que observó la destrucción del velo y la aparición de enjambres bacterianos, “*swarming*”, alrededor de las larvas muertas de *Mercenaria (Venus) mercenaria* tras una infección experimental con *Vibrio*. Tubiash y col. (1965) realizaron una serie de infecciones en distintas especies de moluscos con diferentes bacterias obtenidas de larvas muertas. Algunos de estos aislados provocaron en las larvas una reducción de la movilidad, la extensión del pie rudimentario o del velo y la aparición de un movimiento errático en círculos al cabo de 4-5 horas. Además, el “*swarming*” bacteriano rodeaba a las larvas que se depositaban en el fondo de los tanques. Acuñaron el término necrosis bacilar para definir la enfermedad. En estudios posteriores realizados por el mismo grupo (Tubiash y col., 1970; Tubiash y Otto, 1986), se identificaron estos patógenos como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. tubiashii* y establecieron que el patógeno entraba a través del tracto digestivo. Di Salvo y col. (1978), determinaron que las mortalidades producidas en larvas de ostra en un criadero norteamericano eran debidas a una exotoxina producida por *V. anguillarum* y además, describieron otro síntoma característico de la vibriosis, el “*spotting*”, que consiste en la acumulación de agregados de larvas moribundas en el fondo de los tanques de cultivo.

En los años posteriores y hasta la actualidad hay numerosos estudios que incluyen otras especies del género *Vibrio* en la lista de patógenos de diversos moluscos bivalvos. *Vibrio bivalvicida* y *V. europaeus* son patógenos de ostras (*O. edulis*), almejas (*R. decussatus* y *R. philippinarum*) y coquina (*Donax trunculus*) (Dubert y col., 2016b, c). *Vibrio celticus* ha producido mortalidades del 100% en infecciones experimentales en larvas de almeja fina y japonesa (*R. decussatus* y *R.*

INTRODUCCIÓN

philippinarum) (Beaz-Hidalgo y col., 2010b). Recientemente, se ha identificado a *V. coralliilyticus* como un importante patógeno de ostras (*C. gigas* y *C. virginica*) (Richards y col., 2015) y además, se han asignado a esta especie cepas previamente identificadas como *V. tubiashii*, que habían sido las responsables de mortalidades en distintas especies de moluscos como almeja (*M. mercenaria*), ostra (*O. edulis*) y vieira (*A. irradians*), por lo que se ha ampliado el rango de hospedadores de esta especie de *Vibrio* (Dubert y col., 2017). Además, *V. coralliilyticus*, junto con *V. neptunius*, se han relacionado con mortalidades de mejillón verde (*Perna canaliculus*) en Nueva Zelanda (Kesarcodi-Watson y col., 2009a). *Vibrio neptunius* también ha sido descrito como patógeno para ostra (*O. edulis*) y almeja (*R. philippinarum*) (Prado y col., 2005; Dubert y col., 2016a) y *V. ostreicida* afecta a larvas de ostra (*O. edulis*) (Prado y col., 2014). Pero sin duda alguna, el principal patógeno, referenciado en numerosas ocasiones como causante de pérdidas enteras en la producción de distintos bivalvos, es *V. splendidus*. La homogenicidad del clado *Splendidus* lleva consigo una gran dificultad en la correcta identificación de las especies que lo forman, por lo que muchos de los episodios de mortalidad de bivalvos se achacan a cepas relacionadas con este clado o se asignaron erróneamente a *V. splendidus* y fueron posteriormente reclasificadas. Es el caso, por ejemplo, de una cepa de *V. tasmaniensis*, LGP32, que inicialmente había sido asignada a *V. splendidus*, y que fue la responsable de mortalidades de ostra (*C. gigas*) en las áreas de cultivo en Francia (Gay y col., 2004a, b; Sawabe y col., 2013). *V. splendidus* se ha relacionado con mortalidades de almejas (*R. decussatus*, *R. philippinarum*) (Gómez-León y col., 2005; Saulnier y col., 2010), mejillones (*P. canaliculus*, *M. edulis*) (Kesarcodi-Watson y col., 2009a; Ben Cheikh y col., 2016), ostras (*C. gigas*) (Sugumar y col., 1998; Saulnier y col., 2010) o vieiras (*P. maximus*,

INTRODUCCIÓN

Patinopecten yessoensis, *A. purpuratus*) (Nicolas y col., 1996; Tordkilsen y col., 2005; Sandlund y col., 2006; Liu y col., 2013; Rojas y col., 2015). Nicolas y col. (1996) estudiaron durante 4 años los continuos episodios de mortalidad que se producían en larvas de *P. maximus* en un criadero de Francia. Obtuvieron una serie de cepas patógenas que identificaron como *V. splendidus*, aunque una de ellas presentaba una alta virulencia para las larvas. Posteriormente, estos aislados fueron caracterizados en profundidad y descritos como *V. pectenecida* (Lambert y col., 1998).

El género *Vibrio* es el patógeno más conocido en moluscos, aunque no el único. Algunos miembros del género *Pseudomonas*, aunque al igual que *Vibrio* forman parte de la microbiota normal de los moluscos, se han descrito como importantes patógenos. En la mayoría de las ocasiones, se han aislado junto con representantes del género *Vibrio*, causando muchos problemas en cultivos larvarios de distintas especies de moluscos como almejas (*M. mercenaria*, *Tridacna gigas*), ostras (*C. virginica*, *O. edulis*) o pectínidos (*Euvola ziczac*) (Guillard 1959; Brown 1973, 1974; Lodeiros y col., 1987, 1992; Sutton y Garrik, 1993).

Otros géneros bacterianos se han relacionado de manera menos frecuente con mortalidades o enfermedades de larvas de bivalvos. Es el caso de *Aeromonas*, género asociado a mortalidades importantes en peces, pero que rara vez se ha detectado causando problemas en moluscos. Sutton y Garrik (1993), aislaron este género de larvas moribundas de *T. gigas* y Riquelme y col. (1996a) describieron las mortalidades de *A. purpuratus* en un criadero chileno causadas por *Aeromonas hydrophila*. El género *Alteromonas*, que también forma parte de la microbiota normal de moluscos, se ha vinculado con mortalidades en ostra (*C. gigas*) en un criadero de Tasmania (Garland y

INTRODUCCIÓN

col., 1983). Rojas y col. (2009), identificaron a *Halomonas* como la responsable de las mortalidades recurrentes sufridas en criaderos de *A. purpuratus* en Chile. El mecanismo de infección de esta bacteria es indirecto, debido a que no produce una invasión sistémica ni exotoxinas, sino que forma una biopelícula sobre la concha de las larvas, haciendo que estas se aglutinen, hasta que pierden progresivamente la capacidad de movimiento, se acumulan en el fondo de los tanques y mueren.

Uno de los géneros de bacterias heterótrofas más abundantes en ambientes marinos es el género *Pseudoalteromonas* (Baumann y Baumann, 1981) y, aunque forma parte de la microbiota de distintos moluscos (Ivanova y col., 2002), algunos de sus miembros se han identificado como patógenos oportunistas de *P. maximus*, produciendo mortalidades del 100% en los cultivos larvarios en criadero (Sandaa y col., 2008).

b) Bacterias patógenas de juveniles y adultos

El género *Vibrio*, al igual que en las larvas, es un importante patógeno en las fases posteriores de desarrollo. *Vibrio aestuarianus* y *V. crassostreae* están asociados con numerosos episodios de mortalidad de ostras juveniles (*C. gigas*) en Europa (Garnier y col., 2007; Saulnier y col., 2010; Lemire y col., 2014; Travers y col., 2017). *Vibrio tapetis* es el único patógeno conocido que afecta a almeja adulta (*R. decussatus* y *R. philippinarum*). Es el causante de la enfermedad del anillo marrón, en la que se produce un depósito anormal de material orgánico, fundamentalmente conquiolina, en la concha interna del molusco como defensa frente a la invasión del patógeno. Este depósito ocasiona una deformación de las valvas que impide su cierre y el

INTRODUCCIÓN

animal acaba muriendo (Borrego y col., 1996; Paillard y col., 2008; Balboa, 2012).

Otra de las enfermedades de etiología bacteriana frecuentes en moluscos es la enfermedad de la ostra por *Roseovarius*, ROD (por sus siglas en inglés *Roseovarius Oyster Disease*). Está ocasionada por *R. crassostreae* (Boettcher y col., 2005) que recientemente ha sido reclasificada como *Aliiroseovarius crassostreae* (Park y col., 2015). Fue detectada por primera vez en los años 80 en EEUU (Bricelj y col., 1992) y posteriormente causó importantes mortalidades en poblaciones europeas de ostra (*C. virginica*), su único hospedador conocido (Boettcher y col., 1999; Renault y col., 2002). Esta enfermedad produce una drástica reducción en el crecimiento, un debilitamiento de la concha, que presenta valvas con márgenes irregulares y un abultamiento anormal de la valva inferior, además del depósito de conquiolina en la superficie interna de las mismas (Maloy y col., 2007). Las mortalidades se producen 1 o 2 semanas después de la aparición de los primeros síntomas.

El género *Nocardia* es habitual en los sedimentos marinos y puede actuar como patógeno oportunista (Friedman y col., 1991). Actualmente está formado por más de 100 especies (www.bacterio.net) entre las que se encuentra *N. crassostreae*, causante de la Nocardiosis en ostras (*C. gigas* y *O. edulis*), aunque también se ha detectado recientemente en mejillones en el Mediterráneo (*M. galloprovincialis*) (Elston y col., 1987; Friedman y col., 1998; Engelsma y col., 2008; Carella y col., 2013). Esta enfermedad es frecuente en los meses de verano y otoño, cuando la temperatura del agua es más alta (Travers y col., 2015) y se caracteriza por la presencia de lesiones amarillas o verdes en el manto, branquia o músculo aductor.

c) Procariotas intracelulares: *Rickettsiales*, *Chlamydiales*, *Mycoplasma* y *Francisella*.

Los parásitos intracelulares obligados, principalmente *Rickettsia* y *Chlamydia*, se encuentran comúnmente en las células epiteliales de las branquias y divertículo digestivo de un amplio rango de bivalvos incluidas las vieiras (Harshbarger y col., 1977; Renault y Cochenne, 1994; Hine y Diggles, 2002). La mayoría de las infecciones suelen ser benignas a pesar de la rápida y densa colonización, sin embargo, algunas se convierten en un serio problema en larvas, juveniles o individuos adultos de distintos tipos de moluscos (Villalba y col., 1999; Delgado y col., 2007; Zewen y col., 2012), provocando mortalidades masivas en los cultivos de bivalvos.

En vieiras se han detectado infecciones por estos organismos con distintas consecuencias. Morrison y Shum (1982, 1983) encontraron organismos tipo *Chlamydia* y tipo *Rickettsia* en el divertículo digestivo y en el riñón, respectivamente, de individuos adultos de *A. irradians*. Sugirieron una transmisión vertical de los patógenos, pero la presencia de los mismos no producía ninguna enfermedad. Leibovitz (1989) establece que las clamidias causan enfermedades fatales en larvas y postlarvas de vieiras *A. irradians* en criadero, mientras que los adultos permanecen como vectores de transmisión. Recientemente, Meyer y colaboradores (2017), estudiaron un episodio de mortalidad que mermó las poblaciones cultivadas de vieiras *P. yessoensis* en Canadá en el año 2015. Los animales presentaban pústulas rosadas con pus en el músculo aductor y la glándula digestiva pálida. Los resultados obtenidos en este estudio determinaron que el agente causal de esta enfermedad era *Francisella halioticida*, previamente descrita como responsable de importantes mortalidades de oreja de mar en Japón (Kamaishi y col., 2010; Brevik y

INTRODUCCIÓN

col., 2011). Este género se caracteriza por su gran virulencia en un amplio rango de hospedadores (Nylund y col., 2006; Oyston, 2008).

En 1987 se produjo una mortalidad de aproximadamente el 40% de la vieira cultivada, *P. maximus*, en la Bretaña francesa. Le Gall y col. (1988, 1991, 1992), detectaron y caracterizaron numerosas colonias de procariotas *Rickettsia*-like en las células endoteliales de la branquia de los individuos afectados. Además, establecieron la distribución geográfica en Europa y la vía de transmisión, descartando una transmisión vertical a las larvas.

En *P. novaezelandiae*, Hine y Diggles, (2002), detectaron la presencia de *Rickettsia* en branquias y *Chlamydia* y *Mycoplasma* en células del epitelio digestivo durante un episodio de mortalidad (23-39%) en Nueva Zelanda, aunque consideran que las infecciones individuales de estos patógenos no causarían ningún daño a estos animales, sino que es la presencia conjunta de los tres la que puede estresar fisiológicamente al huésped provocando la aparición de la enfermedad.

1.5.3. Microorganismos beneficiosos

Como se ha mencionado con anterioridad, uno de los puntos críticos en el cultivo de moluscos en criadero es la aparición de bacterias patógenas oportunistas que ocasionan la pérdida completa de los lotes y comprometen la producción regular y la viabilidad de la industria. Los moluscos bivalvos presentan un sistema inmune restringido a una inmunidad innata, por lo que la vacunación no es una opción factible y la prevención de enfermedades en los criaderos se realiza a través de tratamientos profilácticos con antibióticos. Una alternativa al uso de quimioterápicos es la utilización de bacterias probióticas en el sistema de producción o en la alimentación. Hay

INTRODUCCIÓN

numerosas definiciones de probiótico en la literatura, pero la que más se ajusta en acuicultura es la propuesta por Verschuere y col., (2000b) que lo define como un “aditivo microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso en el hospedador al modificar su microbiota asociada o la ambiental, al asegurar un mejor uso de la alimentación o aumentando su valor nutricional, acentuando la respuesta contra la enfermedad o incrementando la calidad de su medio ambiente. La selección de probióticos debe realizarse en el ambiente donde van a ser utilizados, asegurando así la supervivencia en esas condiciones y eliminando el riesgo de introducir especies alóctonas en el sistema. Además, deben de tener un efecto beneficioso en el organismo diana y no pueden ser patógenos para ningún organismo presente en el sistema (Verschuere y col., 2000b; Prado y col., 2010; Romalde y Barja, 2010). Existen diversos mecanismos de acción de un probiótico como la producción de sustancias inhibitorias (Dopazo y col., 1988; Barja y col., 1989; Holmström y Kjelleberg, 1999; Riquelme y col., 2001; Longeon y col., 2004), la competencia por productos químicos, energía o lugares de adherencia con otras bacterias (Rico-Mora y col., 1998; Verschuere y col., 2000a; Balcázar y col., 2006), la mejora de la respuesta inmune del hospedador (De y col., 2014) o de la calidad del agua (Nimrat y col., 2011, 2012), así como la interrupción del Quorum sensing, entre otros (Medellin-Peña y col., 2007; Kesarcodi-Watson y col., 2008; Schereir y col., 2010; Zorriehzahra y col., 2016).

Aunque la mayoría de los estudios realizados con probióticos en acuicultura se han centrado en la producción de peces y crustáceos (Makridis y col., 2005; Balcázar y col., 2007; Ringø y col., 2010; Luis-Villaseñor y col., 2011; D’Alvise y col., 2012) también se han analizado los efectos de este tipo de bacterias en cultivos de distintos moluscos bivalvos. El primero de los estudios conocidos fue realizado por Lodeiros y col., (1989) ensayando la actividad antibacteriana de

INTRODUCCIÓN

Flavobacterium sp. P14 en cultivos de *Euvola* (*Pecten*) *ziczac* infectados con *V. anguillarum*. Muchos de los trabajos posteriores fueron realizados en *A. purpuratus* (Riquelme y col., 1996b, 1997, 2000, 2001; Avendaño y Riquelme, 1999; Jorquera y col., 1999; Avendaño-Herrera y col., 2001) en Chile. En estos estudios comprobaron que *Alteromonas haloplanktis* y *Pseudomonas* sp. proporcionaban a las larvas protección frente a la infección con *V. anguillarum* y que algunas cepas de *Vibrio* sp. y *Bacillus* sp. mejoraban la tasa de supervivencia de las mismas. *Arthrobacter* sp. conseguía desplazar a la microbiota residente en el tracto digestivo de *A. purpuratus* tras 24 h de incubación, estudiaron el uso de microalgas como mejor vía de administración del probiótico y además, demostraron la ingestión selectiva de bacterias por parte de las larvas.

Hasta la fecha, son numerosos los géneros bacterianos ensayados en diversas especies de moluscos o frente a distintos patógenos conocidos, aunque la búsqueda de nuevos probióticos continúa. Se han llevado a cabo ensayos en ostras (*C. gigas*, *C. virginica*, *O. edulis*, *C. corteziensis*) utilizando bacterias de los géneros *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Phaeobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Lactobacillus* y *Pseudoalteromonas*, entre otras (Douillet y Langdon, 1993, 1994; Gibson y col., 1998; Nakamura y col., 1999; Elston y col. 2004; Prado, 2006; Campa-Córdova y col., 2011; Kapareiko y col., 2011; Lim y col., 2011; Kesarcodi-Watson y col., 2012), en mejillones de Nueva Zelanda (*P. canaliculus*) con *Alteromonas* y *Neptunomonas* (Kesarcodi-Watson y col. 2009b, 2010), en almeja japonesa (*R. philippinarum*) utilizando *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* (Castro y col., 2002; Longeon y col., 2004), en distintas especies de oreja de mar (*Haliotis midae*, *H. rufescens* o *H. discus*) ensayando bacterias de los géneros *Shewanella*, *Vibrio*, *Agarivorans*, *Pseudoalteromonas*, *Cryptococcus* y la levadura

INTRODUCCIÓN

Debaryomyces hansenii (Macey y Coyne, 2005, 2006; ten Doeschate y Coyne, 2008; Silva-Aciares y col., 2011; Jiang y col., 2013), en *Nodipecten subnodosus* con *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* (Granados-Amores y col., 2012) o en madreperla (*Pinctada mazatlanica*) ensayando *Lactobacillus* sp., una mezcla de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* o la levadura *Yarrowia lipolytica* (Aguilar-Macías y col., 2010).

Si nos centramos en los estudios realizados en larvas de vieira (*P. maximus*), uno de los géneros más ensayados es *Phaeobacter*. Ruiz-Ponte y col. (1998) aislaron cuatro cepas procedentes de larvas y colectores que presentaban una actividad inhibitoria contra un amplio espectro de bacterias, principalmente *Vibrio* spp. Estas cepas fueron descritas como *Roseobacter gallaeciensis* y reclasificadas años más tarde en un nuevo género llamado *Phaeobacter* (Martens y col., 2006). Una de estas cepas fue estudiada en profundidad por el mismo grupo y ensayada en cultivos larvarios de vieira infectados con *V. anguillarum* (Ruiz-Ponte y col., 1999). Pudieron observar que la mortalidad del cultivo larvario disminuía cuando se añadían a 10^6 céls/ml los extractos celulares obtenidos a partir de la cepa BS107 y concluyeron que esta bacteria protege a los cultivos de algunos patógenos latentes o en bajo nivel en los criaderos, pero no cuando el patógeno ya se encuentra en concentraciones elevadas.

Otro de los géneros con los que se han realizado numerosos ensayos de inhibición es *Pseudoalteromonas*. Este género es un conocido productor de sustancias inhibitorias además de estar ampliamente distribuido en el medio marino y presente habitualmente en la microbiota asociada a los moluscos (Holmström y Kjelleberg, 1999; Holmström y col., 2002; Bowman, 2007; Vynne y col., 2011). Longeon y col. (2004) estudiaron la actividad antibacteriana de

INTRODUCCIÓN

Pseudoalteromonas sp. X153 frente a distintas especies además de ensayar el efecto de la inoculación de esta cepa en cultivos larvarios de *P. maximus*. Pudieron comprobar cómo se reducía 4 veces la tasa de mortalidad en las larvas inoculadas aunque también se veía reducido el tamaño de las mismas.

Kesarcodi-Watson y col. (2012) ensayaron *Phaeobacter gallaeciensis*, *Neptunomonas* sp. 0536, *Alteromonas macleodii* 0444 y *Pseudoalteromonas* sp. D41 en cultivos larvarios de *P. maximus* infectados con *V. splendidus* y *V. corallilyticus*. Los resultados obtenidos demostraron que los cuatro probióticos proporcionaban protección a las larvas frente a *V. splendidus*, mientras que cuando se enfrentaban a *V. corallilyticus* todos mostraban beneficios significativos en la supervivencia de las larvas excepto *Pseudoalteromonas* sp. D41. Tras estos prometedores resultados, el mismo grupo ensayó los cuatro probióticos en larvas de *P. maximus* aplicándolos individualmente y mezclados. Además, también realizaron ensayos de estos probióticos en larvas infectadas con *V. pectenocida* (Kesarcodi-Watson y col., 2016). En este trabajo confirmaron el beneficio obtenido con el uso de los probióticos en el tamaño y rendimiento de las larvas así como la protección frente a patógenos. *Phaeobacter gallaeciensis* y *Alteromonas macleodii* 0444 produjeron el mayor crecimiento y rendimiento en las larvas, *Neptunomonas* sp. 0536 proporcionó el mejor rendimiento absoluto aunque no el mejor crecimiento, mientras que la cepa de *Pseudoalteromonas* sp. no mostró buenos resultados ni en crecimiento ni rendimiento. Además, la mezcla de los probióticos mostró los mejores resultados, junto con los de *P. gallaeciensis*.

Genard y col. (2014) evaluaron el impacto del probiótico *P. gallaeciensis* X34 durante el desarrollo larvario completo, desde la fase veliger hasta la metamorfosis de *P. maximus*, en larvas infectadas con

INTRODUCCIÓN

V. pectenica. Pudieron comprobar que el probiótico proporcionaba un efecto protector frente al patógeno y además incrementaba la tasa de supervivencia y metamorfosis de las larvas, siempre y cuando se realizase un tratamiento previo de las larvas.

2. OBJETIVOS



OBJETIVOS

La producción de moluscos bivalvos está limitada por varios factores entre los que cabe destacar la obtención de semilla de calidad así como la utilización y gestión de sistemas de producción adecuados para su correcto crecimiento. La principal forma de obtención de la semilla es a partir de reproductores que se recolectan en el medio marino, lo que conlleva la sobreexplotación de los bancos naturales y la dificultad para mantener un abastecimiento continuo de moluscos a los mercados. Los sistemas de producción no han evolucionado mucho desde los años 70, por lo que el desarrollo de nuevos métodos de producción que permitan un manejo, gestión y rendimiento mejorados es fundamental.

Los criaderos de bivalvos son sistemas integrados en los que interaccionan numerosos factores físicos, químicos y microbiológicos, formando pequeños ecosistemas. Los estudios realizados hasta la fecha se han centrado, casi en su totalidad, en un sólo parámetro. En el caso de los estudios microbiológicos, se han focalizado en la búsqueda de patógenos o en el estudio de la microbiota presente en uno de los nichos biológicos (agua, larvas...) de un criadero, dejando de lado las interacciones que se producen entre los diferentes compartimentos del sistema.

Este trabajo se realizó dentro del proyecto REPROSEED, financiado a través del 7º Programa Marco de la Unión Europea, cuyo objetivo general era la mejora de la producción y calidad de la semilla de distintos bivalvos en criadero, con el fin de disminuir la dependencia de las capturas de semilla salvaje y las fluctuaciones que se producen en el abastecimiento de los mercados.

En esta tesis doctoral, el objetivo general consistió en estudiar la microbiota asociada a diferentes sistemas de producción de vieira

OBJETIVOS

(*Pecten maximus*) en criadero. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar la microbiota asociada a dos sistemas de producción, recirculación de agua (RAS) y flujo continuo (FTS), a lo largo de un ciclo de producción de *Pecten maximus*.
2. Estudio comparativo de la diversidad de bacterias cultivables presentes en los distintos compartimentos del criadero junto con su evolución.
3. Identificar, caracterizar y describir nuevos taxones bacterianos, intentando descifrar su papel dentro del criadero.

3. RESULTADOS



3.1. Comparación de la microbiota asociada a vieira (*Pecten maximus*) en dos sistemas de cultivo



3.1.1. Comparative study of the culturable microbiota present in two different rearing systems, FTS and RAS, in a Great scallop hatchery

Diéguez, A.L., Balboa, S., Magnesen, T., Jacobsen, A. y Romalde, J.L.

Aquaculture, enviado

Índice de impacto: 2,57; Q1 en Fisheries Sciences.

Tradicionalmente, para el cultivo de vieira (*Pecten maximus*) en Noruega, se han utilizado los sistemas estáticos o los sistemas de flujo continuo de agua (FTS). Debido a que estos últimos sistemas implican un gasto elevado de agua y energía, se han puesto en marcha de forma experimental cultivos en sistemas de recirculación de agua (RAS), para intentar reducir los costes de producción así como mantener un control sobre las poblaciones bacterianas. En este trabajo, se llevó a cabo una comparación de la microbiota presente en los diferentes compartimentos de un criadero en dos sistemas de producción experimentales, FTS y RAS, a lo largo de un ciclo de cría. Todos los aislados obtenidos a partir de gónadas de reproductores, larvas, agua, biopelículas, microalgas, agua tratada con luz ultravioleta (UV) y biofiltro en tres tiempos diferentes en ambos sistemas, se caracterizaron e identificaron mediante pruebas bioquímicas y la secuenciación del gen 16S ARNr. Alguno de los géneros encontrados eran exclusivos de reproductores, como *Sinobacterium*, *Kordia* o *Microbulbifer*, aunque también se detectaron diferencias entre la microbiota de las gónadas antes y después de la puesta. El número de morfotipos obtenidos en agua, larvas y biopelículas fue similar en

RESULTADOS

ambos sistemas, así como el comportamiento de las poblaciones microbianas en casi todos los compartimentos del criadero, en los cuales los géneros *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella* fueron los más comunes. Estos resultados sugirieron que, al menos desde un punto de vista microbiológico, los sistemas de recirculación podrían ser una buena alternativa para la producción de larvas de vieira.

RESULTADOS

Manuscript Details

Manuscript number	AQUA_2017_1411
Title	Comparative study of the culturable microbiota present in two different rearing systems, FTS and RAS, in a Great scallop hatchery
Article type	Research Paper

Abstract

Traditionally, static cultures or continuous water flow systems (FTS) have been used in Norway for the culture of Great scallop (*Pecten maximus*). Since the latter system has a high cost of water and energy expenditure, the aquaculture recirculation system (RAS) was implemented in order to reduce production costs and also to maintain a control over the bacterial populations. In this work, a comparison of the microbiota present in the different compartments in two experimental production systems, FTS and RAS, throughout a cycle of larvae rearing was carried out. All isolates obtained from broodstock gonads, larvae, tank water, biofilm, microalgae, UV treated water and biofilter in both systems at three sampling times were characterized by biochemical tests and identified by sequencing of the 16S rRNA gene. Some of genera were found to be exclusive of broodstock gonads, such as *Sinobacterium*, *Kordia* or *Microbulbifer*, and differences between gonad microbiota before and after spawning were detected. The number of morphotypes obtained in water, larvae and biofilm were similar in both systems, as well as the behavior of the microbial populations in almost all hatchery compartments, in which *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* and *Shewanella* were the most common genera. These results suggest that, at least from a microbiological point of view, the recirculation system could be a good alternative for production of scallop larvae.

Keywords	molluscan microbiota; recirculating aquaculture system; flow-through system; aquaculture; Great scallop.
Taxonomy	Aquatic Species, Bacteriology
Manuscript category	Production science
Corresponding Author	Jesus L. Romalde
Corresponding Author's Institution	Universidade de Santiago de Compostela
Order of Authors	Ana L. Diéguez, Sabela Balboa, Thorolf Magnesen, Anita Jacobsen, Jesus L. Romalde

RESULTADOS

1 **Comparative study of the culturable microbiota present in two different**
2 **rearing systems, FTS and RAS, in a Great scallop hatchery.**

3

4 **Ana L. Diéguez¹, Sabela Balboa, Thorolf Magnesen², Anita Jacobsen^{2*}, Jesús L.**
5 **Romalde^{1*}.**

6 ¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología,
7 Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

8 ² Department of Biology. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. University of
9 Bergen. Bergen, Norway.

10

11

12

13 **Runing title:** Comparative study of microbiota present in two rearing systems

14

15 * Present address: Institute of Marine Research, Nordnesgaten 50, 5005 Bergen,
16 Norway

17

18 *Corresponding author:

19 Tel: (+34) 881816908

20 Fax: (+34) 881816966

21 E-mail: jesus.romalde@usc.es

22

RESULTADOS

23 **Abstract**

24 Traditionally, static cultures or continuous water flow systems (FTS) have been used in
25 Norway for the culture of Great scallop (*Pecten maximus*). Since the latter system has
26 a high cost of water and energy expenditure, the aquaculture recirculation system
27 (RAS) was implemented in order to reduce production costs and also to maintain a
28 control over the bacterial populations. In this work, a comparison of the microbiota
29 present in the different compartments in two experimental production systems, FTS
30 and RAS, throughout a cycle of larvae rearing was carried out. All isolates obtained
31 from broodstock gonads, larvae, tank water, biofilm, microalgae, UV treated water and
32 biofilter in both systems at three sampling times were characterized by biochemical
33 tests and identified by sequencing of the 16S rRNA gene. Some of genera were found
34 to be exclusive of broodstock gonads, such as *Sinobacterium*, *Kordia* or *Microbulbifer*,
35 and differences between gonad microbiota before and after spawning were detected.
36 The number of morphotypes obtained in water, larvae and biofilm were similar in both
37 systems, as well as the behavior of the microbial populations in almost all hatchery
38 compartments, in which *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas* and *Shewanella*
39 were the most common genera. These results suggest that, at least from a
40 microbiological point of view, the recirculation system could be a good alternative for
41 production of scallop larvae.

42

43

44

45 **Keywords:** Mollusc microbiota, Recirculating aquaculture system, Flow-Throught
46 system, Aquaculture, Scallop.

48 1. Introduction

49 With a coastline of over 83,000 km, including fjords and islands, Norway is one of the
50 leading countries in aquaculture and fisheries production. This sector represented 0.7%
51 of GDP in 2010, being one of the most important in number of international operations
52 only surpassed by oil and gas (FAO, 2013). In fact, almost half of Norwegian exports
53 correspond to products from aquaculture. Atlantic salmon and rainbow trout are the
54 main species of the aquaculture industry, although a variety of new species such as
55 cod, halibut, catfish and certain varieties of shellfish, are experiencing a great
56 development with a view to export. This is the case of great scallop, *Pecten maximus*,
57 a species with high commercial potential due to the existence of well-established
58 markets in Europe (Strand and Vølstad, 1997; Bergh and Strand, 2001). The annual
59 production of this mollusc in Norway has significantly increased in the last decade, from
60 1 t in 2003 to 21 t in 2015 (Statistics Norway, 2017), although the culture of this species
61 is still moderate. One of the main limiting factors is the availability of seed, an essential
62 factor in the farming of molluscs of commercial interest. The overexploitation of natural
63 beds and the subsequent difficulty in obtaining wild seed make necessary the
64 controlled production of seed, although the amount obtained in hatcheries is highly
65 variable due to the low survival rate of larvae, often associated with bacterial infections
66 (Riquelme *et al.*, 1995b; Nicolas *et al.*, 1996) or water quality (Torkildsen and
67 Mognesen, 2004; Abasolo-Pacheco *et al.*, 2009).

68 Another important factor to larvae survival is the production system used in hatcheries.
69 The technology used in bivalve hatcheries has not evolved much since the 60s.
70 Traditionally, shellfish larvae aquaculture was performed in batch (static) systems
71 where a water change is performed 3 to 4 times a week usually associated with the
72 addition of an antibiotic such as chloramphenicol, but the use of this antibiotic has been
73 banned in the European Union for the production of organisms for human consumption
74 (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). The scallop industry tried then to develop

RESULTADOS

75 production strategies that do not use antibacterial agents (Torkildsen *et al.*, 2002). In
76 that sense, the production system was switched to continuous-flow through systems
77 (FTS) (Andersen *et al.*, 2000; Magnesen *et al.*, 2006). In these systems, the cost of
78 labor and the manipulation of the larvae is reduced and a more stable environment is
79 created, but the amount of water and energy required is very high and also the quality
80 of water varies widely. An alternative system of production, the recirculation system
81 (RAS) already well known in fish farming (Masser *et al.*, 1999) is now being
82 experienced in molluscan hatcheries. This system provides greater control of water
83 quality and reduces the expenditure of water and energy (Magnesen *et al.*, 2012). All
84 these systems encompass many microniches for bacterial growth including biofilters or
85 tank surfaces (Sharrer *et al.*, 2005; Michaud *et al.*, 2009; Schreier *et al.*, 2010).
86 Although it is well known that the quality of water in these systems is directly related to
87 the associated microbial communities, most of the microbiological studies in
88 aquaculture have generally been focused on the detection of pathogenic bacteria to
89 prevent mortality events and the use of antibiotics. Therefore, most of these
90 communities have not been studied in depth (Sugita *et al.*, 2005) although a thorough
91 knowledge of the microbiota associated with a production system would provide
92 essential information, not only regarding the potential pathogens but also about those
93 microorganism with inhibitory or biocontrol capacities (Smith and Davey, 1993; Austin
94 *et al.*, 1995; Gram *et al.*, 1999; Michaud *et al.*, 2006). Such information could be a key
95 factor to improve the culture success increasing larval survival rates.

96 In this context, the objective of this work was to identify and to compare the microbiota
97 associated with two different production systems, FTS and RAS, in a Norwegian
98 hatchery of Great scallop.

99

100

RESULTADOS

101 **2. Material and methods.**

102 *2.1. Sampling*

103 Two larval experimental systems were assayed in a commercial scallop hatchery,
104 Scalpro A.S., located at Bergen, Norway. FTS with a continuous flow of new seawater
105 equal to 100% replacement of volume per day, and RAS where only 20% of water was
106 replaced each day.

107 Samples were taken in the period from January to February 2011 during a production
108 cycle. Broodstock gonad were analized before and after spawning. After spawning,
109 larvae were distributed into the two systems, RAS and FTS. Tank water, biofilm,
110 microalgae, biofilter (RAS), water treated with UV light (RAS) and larvae of both
111 systems were sampled every seven days coinciding with larval stages D3, D10 and
112 D17 (3, 10 and 17 days old respectively) (Fig. 1).

113 *2.1.1. Broodstock*

114 The spawning was induced by thermal shock, and eggs were fertilized by the
115 method described by Gruffyd and Beamont (1970). Before and after spawning, the
116 external surface of scallop was washed by scrubbing under running water, washed with
117 70% ethanol and allowed to dry. Shellfish were then opened aseptically by cutting the
118 adductor muscle with a sterile scalpel. One g of the female and male gonad tissues
119 were homogenized in 1 ml of sterile seawater (SSW). The mixture was serially diluted
120 and 100 µl of direct sample and appropriated dilutions were inoculated onto marine
121 agar 2216 (MA; Difco) and Thiosulphate Citrate Bile Sucrose medium (TCBS; Oxoid).

122 *2.1.2. Water*

123 Serial dilutions of tank water were prepared in sterile seawater (SSW) and 100
124 µl were spread on MA and TCBS medium. Same protocol was used for UV water

RESULTADOS

125 treated samples but only direct sample and one dilution were spread onto MA and
126 TCBS media.

127 2.1.3. Larvae

128 Larvae were sampled every 7 days, corresponding with 3 days old, 10 days old
129 and 17 days old larvae. Larvae were collected in an eppendorf tube, homogenized and
130 serially diluted with SSW. Direct sample and dilutions were spread onto MA and TCBS
131 medium.

132 2.1.4. Biofilm

133 A sterile swab was passed by the surface of the tank, and spread directly onto
134 plates of MA and TCBS medium.

135 2.1.5. Microalgae.

136 Larvae were fed with a mixture of the single celled algae *Isochrysis* sp. (*T-iso*
137 strain CCAP 927/14), *Pavlova lutheri* CCAP 931/1, *Chaetoceros muelleri* CCAP 1010/3
138 and *Skeletonema costatum* CCAP 1077/5 at a ratio 3:2:3:1, and with a small quantities
139 (1%) of *Chaetoceros calcitrans f pumilum* CCAP 1010/11, *Tetraselmis suecica* CCAP
140 66/4 and *Rhodomonas* sp. Samples of microalgae were taken, homogenized and
141 serially diluted in SSW. 100 µl of direct sample and dilutions were spread onto MA and
142 TCBS medium.

143 2.1.6. Biofilter

144 Due to technical conditions, the biofilter only could be sampled at the end of the
145 cycle in RAS system. The samples were collected with a sterile swab and spread on
146 MA and TCBS plates.

147

148

RESULTADOS

149 2.2. Bacterial isolation and characterization

150 Marine Agar and TCBS plates were incubated at room temperature during 15 and 3
151 days, respectively. All different morphotypes detected on plates were isolated as pure
152 cultures and stored at -80 °C in marine broth (MB; Pronadisa) supplemented with 20%
153 (v/v) glycerol.

154 After purification, morphology and motility of isolates were observed by light
155 microscopy (DM750; Leica). Catalase activity was determined based on bubble
156 production in H₂O₂ and oxidase activity was analyzed by oxidation of 1% (w/v)
157 N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine. Gram character was determined following
158 the methodology described by Buck (1982). The organisms were grouped following
159 their oxidative or fermentative metabolism. This character was determined in parallel
160 with methods of Hugh and Leifson (1953) and ZOF (Lemos *et al.*, 1985).

161 Fermentative bacteria were identified according to Noguerola and Blanch (2008), using
162 the following test: Arginine dihydrolase (Møller), lysine and ornithine decarboxylase
163 (Møller), growth at 0%, 6%, 8% and 10% NaCl, growth at 4°C, 35°C and 40°C, citrate,
164 indole, urease, glucose gas, NO₂, ONPG, Voges-Proskauer test, utilization of D-
165 mannose, α- ketoglutarate, melibiose, amygdalin, D-glucosamine cs, L-arabinosa cs
166 and acid production from arabinose, mannitol and sucrose. Gelatinase, lipase, and
167 hydrolysis of aesculin and starch activities were analyzed on MA plates supplemented
168 with 0.4%, 1%, 0.1% and 0.4% (w/v) of substrates, respectively.

169 Oxidative bacteria were identified by sequencing of 16S rRNA gene. Isolation of DNA
170 from pure cultures was performed using the 'Instagene' matrix (Bio-Rad), following the
171 manufacturer's recommendations. Amplification of 16S rRNA gene of the different
172 strains was carried out using primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and
173 1510R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT) as previously described by Lane (1991). The

RESULTADOS

174 identification of representative *Vibrio* strains was confirmed by sequencing of 16S
175 rRNA gene following this same methodology.

176 Sequence data analysis was performed with the DNASTAR Lasergene SEQMAN
177 program. Sequences of the isolates were subjected to search against EzTaxon-
178 extended database (Kim *et al.*, 2012). Sequences from the closest relatives were
179 retrieved from GenBank/EMBL.

180 3. Results

181 3.1. Broodstock

182 Broodstock gonad was analyzed before and after spawning. A total of 40 different
183 morphotypes were isolated before spawning. Nine of these strains belonged to
184 *Sinobacterium norvegicum*, which was the most abundant species in these samples
185 (22.5% of total strains). Isolates identified as *Vibrio tubiashii* constituted 12.5% (5/40).
186 Four isolates were identified as *Vibrio fortis* (10%) and another 4 strains were classified
187 as *Vibrio pelagius* (10%). *Vibrio splendidus* and *Kordia sp.* appeared at a rate of 7.5%,
188 (3/40) each one. The remaining isolates were identified as *Vibrio agarivorans*,
189 *Brevundimonas vesicularis*, *Paracoccus marcusii*, *Pseudomonas geniculata*,
190 *Psychrobacter sp.*, *Ruegeria atlantica*, *Ruegeria sp.*, *Shewanella dovmarinensis*,
191 *Microbulbifer sp.*, *Thalassomonas sp.*, *Marinobacter algicola* and *Roseovarius*
192 *scapharcae* with only 1 strain each one (2.5%) (Table 1).

193 Thirty-five different morphotypes were obtained in broodstock gonad after spawning. In
194 this case, 25.7% of isolates belonged to *Vibrio pelagius*. *Sinobacterium norvegicum*
195 and *Tenacibaculum sp.* appeared with 4 isolates each one, which constituted an 11.4%
196 of total strains. Three morphotypes belonged to *Thalassomonas haliotis* (8.6%) and
197 two strains were identified as *Vibrio fortis* (5.7%), and *Pseudomonas xanthomarina*
198 (5.7%). The remaining isolates represented the 2.86% each one and were identified as
199 *Vibrio splendidus*, *Vibrio orientalis*, *Vibrio tubiashii*, *Thalassomonas sp.*, *Microbulbifer*

RESULTADOS

200 sp., *Ruegeria* sp., *Shewanella* sp., *Sulfitobacter* sp., *Colwellia* sp., *Kordia* sp. and
201 *Psychrobacter submarinus* (Table 1).

202 3.2. Larvae

203 In RAS system, at D3 time 12 different morphotypes were obtained. Three of these
204 isolates (25%) were identified as *Vibrio gigantis*. Same percentage was detected for
205 different *Pseudoalteromonas* sp. while the 16.7% of the isolates was constituted by
206 *Neptuniibacter pectenicola*. The remaining isolates were classified as *Vibrio*
207 *mediterranei* (8.3%), *Shewanella dovmarinensis* (8.3%), *Croceibacter atlanticus* (8.3%)
208 and *Alteromonas addita* (8.3%).

209 Diversity of morphotypes decreased in time D10. Only 4 different strains were isolated
210 and identified as *Vibrio chagasii* (50%), *Shewanella* sp. (25%) and *Pseudoalteromonas*
211 spp. (25%)

212 Another 4 different isolates were obtained in larvae D17. Isolates with fermentative
213 metabolism were identified as *Vibrio fortis* (50%) while oxidative strains were classified
214 as *Colwellia aestuarii* (25%) and *Pseudoalteromonas* sp. (25%) (Table 2)

215 At D3 in FTS system, 11 isolates were obtained. Three of these isolates were identified
216 as *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudoalteromonas undina* and *Pseudoalteromonas*
217 *espejiana*. Two isolates were classified as *Vibrio gigantis* (18.2%), 2 strains were
218 classified as *Shewanella piezotolerans* (18.2%) and another 2 isolates were identified
219 as *Neptuniibacter pectenicola* and *Neptuniibacter caesariensis* (9.1% each one). The 2
220 remaining strains were identified as *Arcobacter lekithochrous* and *Croceibacter*
221 *atlanticus*.

222 Diversity of isolates obtained at time D10 (4) decreased, as well as at D17 (3). Two of
223 these isolates (50%) presented fermentative metabolism and they were identified as
224 *Vibrio splendidus*. One morphotype with oxidative metabolism belonged to *Colwellia*

RESULTADOS

225 *aestuarii* (25%) and the other one was identified as *Neptuniibacter* sp. (25%). The 3
226 morphotypes isolated in D17 stage were classified as *Vibrio pelagius*, *Vibrio*
227 *corallilyticus* and *Pseudoalteromonas* sp. (Table 2).

228 3.3. Water

229 In RAS system, 6 morphotypes were obtained at D3 and all of them displayed oxidative
230 metabolism. Sequencing of 16S rRNA gene revealed that these strains belonged to
231 *Neptuniibacter marinus*, *Pseudoalteromonas* sp. and *Phaeobacter arcticus*. Genus
232 *Vibrio* appeared in the system at D10 together with *Shewanella* and *Sulfitobacter*.
233 *Neptuniibacter* and *Pseudoalteromonas* persisted in tank water until the end of the
234 cycle, when were displaced by *Vibrio*, *Paraglaciecola* and *Marinomonas* spp. (Table 3).

235 In FTS system, 9 morphotypes were obtained at D3 and they were classified as *V.*
236 *splendidus*, *Shewanella dovemarinensis*, *Shewanella woodyi*, *Olleya marilimosa*,
237 *Colwellia aestuarii*, *Pseudoalteromonas* sp. and *Arcobacter lekithochrous*. Bacteria
238 belonging to *Vibrio* and *Colwellia* endured in the system at D10 while the rest of
239 detected genera disappeared, although *Pseudoalteromonas* sp. reappeared at the end
240 of the cycle, together with *Vibrio* and *Marinobacter* spp. (Table 3).

241 3.4. Biofilm

242 Initially, biofilm of RAS system was composed by 5 different isolates. These bacteria
243 were identified as *Vibrio chagasii* (20%), *Vibrio gigantis* (20%), *Shewanella*
244 *piezotolerans* (20%), *Pseudoalteromonas hodoensis* (20%) and *Aestuariibacter* sp.
245 (20%).

246 At D10, the number of isolates was maintained but fermentative strains increased,
247 constituting up to 80% of total isolates. The identification of the isolates revealed that
248 the biofilm was formed by *Vibrio hepatarius* (20%), *Vibrio splendidus* (40%), *Vibrio*
249 *fortis* (20%) and *Shewanella violacea* (20%).

RESULTADOS

250 In the last sampling, the fermentative/oxidative bacterial rate was maintained as well as
251 the number of different isolates obtained. Three of these bacteria were identified as
252 *Vibrio splendidus* (60%), one isolate was classified as *Vibrio fortis* (20%) and the
253 remaining strain belonged to *Neptuniibacter marinus* (20%) (Table 4).

254 Seven different isolates were obtained from biofilm in FTS at D3. Three of these
255 isolates were identified as *Vibrio chagasii* (42.9%) and the remaining morphotypes
256 were classified as *Vibrio gigantis*, *Neptuniibacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp. and
257 *Paraglaciecola chathamensis*.

258 Four different isolates were obtained at D10. All of them belonged to genus *Vibrio* and
259 they were identified as *Vibrio splendidus* (75%) and *Vibrio fortis* (25%). This genus was
260 present throughout the cycle, represented by *Vibrio splendidus* (25%), *Vibrio*
261 *hemicentroti* (25%) and *Vibrio chagasii* (25%) at D17 (Table 4), together with
262 *Neptuniibacter pectenicola* (25%).

263 3.5. Microalgae

264 The seven morphotypes obtained at D3 were identified by 16S rRNA gene sequencing
265 and classified as *Alteromonas macleodii* and *Alteromonas* sp. (14.3% each one),
266 *Sulfitobacter pontiacus* (14.3%), *Ruegeria scottomollicae* (14.3%), *Marinobacter*
267 *sediminum* (14.3%), *Muricauda aquimarina* (14.3%) and *Jejuia* sp. (14.3%).

268 The diversity of morphotypes decreased with time and only *Marinobacter* sp. and
269 *Alteromonas macleodii* remained at D10. The genus *Marinobacter* is the only one that
270 persisted in the system during the complete cycle, being detected together with
271 *Phaeobacter* sp., *Sulfitobacter* sp. and *Vibrio splendidus* at D17 time in a percentage of
272 25% each one (Table 5).

273 3.6. Biofilter

274 Due to technical conditions, the biofilter was analyzed only in the recirculation system.

RESULTADOS

275 Initially, only 2 isolates were obtained, both identified as *Vibrio pelagius*. Two different
276 strains were isolated from D10 samples and identified as *Neptuniibacter marinus* and
277 *Sulfitobacter marinus*.

278 A higher number of isolates was obtained at D17 (6 isolates). All of them presented
279 oxidative metabolism and belonged to *Aestuariibacter halophilus* (16.7%), *Alteromonas*
280 *macleodii* and *Alteromonas* sp. (16.7% each one), *Neptuniibacter marinus* (16.7%),
281 *Paraglaciecola* sp. (16.7%) and *Colwellia* sp. (16.7%) (Table 6).

282 3.7. UV treated water

283 All bacteria present in water previously treated with ultraviolet light showed an oxidative
284 metabolism.

285 Three different morphotypes were obtained at D3, classified as *Phaeobacter* sp.
286 (66.7%) and *Marinobacter algicola* (33.7%). These two genera disappeared from the
287 system at D10 being displaced for other bacteria, namely *Colwellia* sp. (20%),
288 *Pseudomonas sabulinigri* (20%), *Pseudoalteromonas* sp. (20%), *Alteromonas* sp.
289 (20%) and *Neptuniibacter marinus* (20%). At the end of the experiment, only
290 *Pseudoalteromonas* sp. and *Marinomonas* sp. were detected in the UV treated water
291 (Table 7).

292 4. Discussion

293 Due to their character of filter feeders, the microbiota of shellfish is strongly influenced
294 by the environment in which they live (Sugita *et al.*, 1981; Ortigosa *et al.*, 1995; Pujalte
295 *et al.*, 1999; Beleneva *et al.*, 2003; Cavallo *et al.*, 2009). Thus, in a hatchery we can
296 find that the microorganisms present in the water tank are also present in animals, so
297 the quality of inlet water in the plant and the distinct filtration systems can make a
298 substantial difference from a microbiological point of view (Skjermo and Vadstein,
299 1999; Magnesen *et al.*, 2013). Feeding with microalgae is another input of bacteria in

RESULTADOS

300 the system despite the efforts focused on the maintenance of axenic cultures of
301 phytoplankton. Therefore, although inevitably become a source of microorganisms in
302 the system, they could even be beneficial in the development of larvae (Riquelme and
303 Avendaño-Herrera, 2003; Nicolas *et al.*, 2004; Natrah *et al.*, 2013). On the other hand,
304 the agents responsible of larval mortalities in hatcheries are often part of the normal
305 microbiota (Romalde and Prado, 2011). Potential bacterial pathogens are widely
306 distributed as saprophytes or commensals of marine organisms (Tubiash *et al.*, 1965)
307 and not exclusively associated with sick individuals. These bacteria are tolerable at
308 certain levels if other environmental factors are favourable (Jeffries, 1982).

309 All these factors make the study of the general microbiota present in each
310 compartment of a hatchery a key element, because it can provide essential information
311 for the improvement of larval development and survival.

312 In the first part of this experiment broodstock gonads were analyzed before and after
313 spawning. The number of isolates obtained in both cases was very similar, 40 and 35
314 respectively, as well as the ratio between fermentative/oxidative isolates, which was
315 approximately 40/60%. Several bacterial genera were exclusive from broodstock and
316 were present both before and after spawning. Among them a group of isolates
317 belonging to genus *Sinobacterium* were detected and described as the novel species
318 *Sinobacterium norvegicum* (Diéguez *et al.*, 2015). On the other hand, some differences
319 between gonads before and after spawning were found. Thus, the diversity of oxidative
320 bacteria was higher than that of vibrios and some genera appeared before spawning
321 and disappeared afterwards and viceversa. As Elston (1989) suggested, broodstock
322 could be one route for larval and system infection by pathogens. Studies in *Argopecten*
323 *purpuratus*, have demonstrated the presence of potential pathogens in the gonads of
324 organisms from rearing and natural banks (Chavez and Riquelme, 1994). These same
325 authors found that *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Moraxella* were the
326 predominant genera present in gonadal tissues of *A. purpuratus* (Riquelme *et al.*, 1994;

RESULTADOS

1995a). In our case, the presence of *Vibrio* and *Pseudomonas* was detected in *Pecten maximus* gonad, while *Moraxella* and *Acinetobacter* were not found. These results contrast to those of a recently published study (Lasa *et al.*, 2016), where the scallop gonad microbiota was analysed by pyrosequencing techniques, and in which bacteria belonging to *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Moraxella* were present but *Vibrio* was no detected.

The involvement of vibrios in episodes of mortality in larvae of cultured bivalve molluscs is well documented (Lambert *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 1996; Tubiash *et al.*, 1965). In our study, the presence of *Vibrio splendidus* and *Vibrio tubiashii* in broodstock gonads was detected. *Vibrio tubiashii* was only found in broodstock, whereas *Vibrio splendidus* also appeared in larvae in FTS.

Regarding larvae, we detected an important decrease in number and diversity of morphotypes obtained over time. The genus *Vibrio* was present in all samples, although their representatives changed, just as *Pseudoalteromonas* sp., which appeared in all samples. This behavior is common to larvae in both systems, RAS and FTS. Representatives of the genus *Neptuniibacter* and *Arcobacter* detected in larvae in FTS were described as new species, *Neptuniibacter pectenicola* and *Arcobacter lekithochrous* (Diéguez *et al.*, 2017a; 2017b).

Most of studies carried out on microbiota of cultured molluscan larvae are focused on the detection of pathogenic bacteria that compromise the survival of the cultures or, on the contrary, on the use of beneficial bacteria that improve the production of these organisms (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2006; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Romalde and Barja, 2010; Rojas *et al.*, 2015).

Still, a few studies regarding general microbiota associated to molluscs showed that, as in the case of *P. maximus*, *Vibrio* and *Pseudoalteromonas* genera are detected among

RESULTADOS

352 the main microbial populations of larvae (Pujalte *et al.*, 1999; Beleneva *et al.*, 2003;
353 Sandaa *et al.*, 2003; Godoy *et al.*, 2011).

354 As it was mentioned before, the larval microbiota is closely related to that of the water
355 in which they live, so as could be expected the number of morphotypes decreased both
356 in larvae and water thorough the time of the experiment. Water was free of vibrios only
357 at D3, which can be explained by the presence of *Phaeobacter* in the system. The
358 ability of *Phaeobacter* to inhibit vibrios and other common pathogens in aquaculture is
359 widely referenced (Ruiz-Ponte *et al.*, 1999; Prado *et al.*, 2009; D'Alvise *et al.*, 2010;
360 Prol-García and Pintado, 2013). As expected, the percentage of vibrios increased
361 when this bacterium disappeared from the water (i.e., D10).

362 At the beginning of the experiment, both larvae and tank water in RAS shared
363 microbiota formed by *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia*, *Neptuniibacter* and
364 *Shewanella*. This population evolved with time and, at the end of the experiment, only
365 *Vibrio* was a common bacterium in these two compartments, constituting the 50% of
366 the total microbiota. Same results were obtained in FTS but also *Pseudoalteromonas*
367 was able to remain in the water and larvae in this system. It has been reported that
368 RAS systems show theoretically, a greater capacity than FTS systems to maintain and
369 stabilize the microbial population in marine hatcheries (Attramadal *et al.*, 2012), but
370 differences between both systems in the present study were irrelevant. The microbial
371 populations present in RAS and FTS were very similar as well as its behavior,
372 throughout time.

373 The microbial community conforming the biofilm plays a basic role in culture of
374 molluscs in hatchery. The biofilm can supply a food source to juveniles and act as a
375 natural biofilter degrading excessive nutrients (Qian *et al.*, 2007). Also, numerous
376 studies related the chemical compounds produced by bacteria in biofilms with the
377 induction of larval settlement of commercial bivalve (Zhao *et al.*, 2003; Leyton and

RESULTADOS

378 Riquelme, 2008; Wassnig and Southgate, 2012). The bacteria present in the biofilm
379 were also part of the microbiota found in the tank water and in larvae, but these
380 populations progressed in a different manner throughout production cycle. Thus, vibrios
381 were the main bacteria in RAS and FTS system, especially those belonging to
382 *Splendidus* clade. These bacteria increased to become the 75-80% of total bacteria
383 competing and displacing other genus like *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* or
384 *Aestuariibacter* in RAS and *Pseudoalteromonas* and *Paraglaciecola* in FTS whereas
385 the genus *Neptuniibacter* persisted in the biofilm of both systems.

386 Several studies have demonstrated that a large number of *Pseudoalteromonas* spp.,
387 mostly pigmented species, exhibit antifouling activities (Holmström *et al.*, 1999; 2002).
388 However, in our study, *Pseudoalteromonas* also disappeared from the biofilm but they
389 were non-pigmented species, which may explain the disappearance of this bacterium
390 from the system if they are not able to produce secondary metabolites to inhibit the
391 attachment of species with a better fitness (Egan *et al.*, 2002; Vynne *et al.*, 2011).

392 As mention before, another important inlet of microorganisms is the microalgae due to
393 the impossibility to maintain axenic cultures in hatcheries. Although the microalgae
394 circulate throughout the production circuit, the bacterial populations associated with
395 these phytoplankton do not remain in all compartments of both systems. Several
396 studies in bacterial communities associated to microalgae present Cytophaga-
397 Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) group together with α - and γ -*Proteobacteria* as
398 dominant in microalgae (Hold *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2004; Grossart *et al.*, 2005;
399 Jasti *et al.*, 2005). These groups were also detected in the present study, although only
400 members of α -*Proteobacteria* (*Phaeobacter* and *Sulfitobacter*) and γ -*Proteobacteria*
401 (*Vibrio* and *Marinobacter*) remained in the microalgae at the end of the experiment.

402 The principal functions of biofilters are nitrification and denitrification of dissolved
403 organic nitrogen compounds which are toxic for cultivated animals. Genera like

RESULTADOS

404 *Nitrosomonas* or *Nitrobacter* are common in biofilter populations but they were not
405 detected in this study, probably due to the utilization of a general media which is not
406 covering the nutritional requeriments of these bacteria. Using MA, we were able to
407 isolate *Vibrio*, *Aestuariibacter* or *Colwellia* which can reduce nitrates and other genera
408 like *Neptuniibacter*, *Alteromonas* or *Paraglaciecola* which are not able to do it. Such
409 and van Rijn, (1992) described a filter characterized by a heterogeneous distribution of
410 nitrifiers and a high diversity of not nitrifying bacteria and unexpected results of
411 denitrification are observed frequently due to not optimal conditions in the filter (van
412 Rijn, 1996). The number of isolates and the biodiversity found in biofilter increased
413 along the time and by the end of experiment, the microbiota was composed by
414 oxidative bacteria such as *Neptuniibacter*.

415 As previously mentioned, the water quality is essential for the proper functioning of
416 cultures. One of the control systems is water continuous disinfection by using ultraviolet
417 radiation. This radiation can denature the DNA of the microorganisms, causing their
418 death or inactivation (Liltved, 2002). But many bacteria have developed mechanisms of
419 DNA repair (Hess-Erga *et al.*, 2008) and, in addition, the effectiveness of this radiation
420 is limited by the adherence of bacteria to suspended particles that protect them (Wu *et*
421 *al.*, 2005). Consequently, detection of bacteria after UV treatment is usual. In this
422 study, a number of these bacteria is variable, as well as their taxonomy. This
423 recolonization by bacteria after exposure of the water to UV light is described in
424 numerous studies (Hijnan *et al.*, 2006; Hess-Erga *et al.*, 2010). In our work, as in the
425 analysis of Hess-Erga *et al.* (2010), the system was initially colonized by α -
426 *Proteobacteria* that were displaced by γ - *Proteobacteria*, indicating a shift to a more
427 stable population dominated by K-strategists. Interestingly, although vibrios are present
428 in most of the compartments of both systems they were not detected in irradiated water
429 in any case.

RESULTADOS

430 The general behavior of the microbiota analyzed in both systems is quite similar but,
431 the origin, colonization or circulation of microorganisms amongst different
432 compartments could not be established beyond being common to two or more
433 compartments. However, for a few cases, such as *V. fortis* and *Shewanella* in RAS
434 system or *V. splendidus* in FTS, a noticeable pattern was observed. Hence, these
435 species appeared in broodstock gonad before and after spawning and later in larvae,
436 water and conforming the biofilm at D10 and D17. Thus, the entrance of these bacteria
437 into the system could be due to vertical transmission from the broodstock to the larvae
438 (Riquelme *et al.*, 1994; Schulze *et al.*, 2006; Sandaa *et al.*, 2008; Dubert *et al.*, 2016).

439 Most of the microbiological studies related to mollusc production are based on the
440 individual study of the compartments of a hatchery like microalgae and biofilter, or they
441 are focused on the search for pathogens. Nevertheless, a hatchery represents a
442 complicated ecosystem and the interactions that occur between the different
443 compartments are highly complex, so it is necessary to perform physical and biological
444 studies with an integrative vision of the entire production system (Michaud *et al.*, 2009;
445 Blancheton *et al.*, 2013). The comparative studies of the evolution and development of
446 microbial populations, role of microbial population in biogeochemical cycles in
447 hatchery, control and management of harmful or beneficial bacteria, interactions
448 between bacteria and microalgae, as well as between bacteria and rearing animals are
449 essential to obtain an overview of hatchery operations and to optimize the production
450 systems.

451 Previous studies conducted in the same hatchery did not find any significant
452 differences in growth, survival and yield of scallop larvae in RAS and FTS (Magnesen
453 and Jacobsen, 2012). In addition, the survival and growth of the larvae was not
454 significantly different between the two systems analyzed in this work (data not show).
455 Overall, these results suggest that recirculation system could be a good alternative in
456 the intensive production of molluscs in nursery although more in-depth studies and

RESULTADOS

457 combined of all physical, chemical and biological processes that are involved in a
458 production system are necessary.

459

460 **Acknowledgments**

461 This work was supported in part by project 245119 (REPROSEED) from
462 KBBE-2009-1-2-11 Subprogram of the 7th Framework Programme (FP7) European
463 Commission.

464

465

466 **References**

467 Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J.M., Saucedo, P.E. 2009. Response and
468 condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus*
469 reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture* 296, 255-262.

470 Andersen, S., Burnell, G., Bergh, Ø. 2000. Flow-through systems for culturing great
471 scallop larvae. *Aquacult. Int.* 8, 249-257.

472 Attramadal, K.J.K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O., Olsen,
473 Y. 2012. Recirculation as a microbial control strategy in intensive aquaculture of marine
474 larvae. *Aquacult. Eng.* 46, 27-39.

475 Austin, B., Stuckey, L.F., Effendi, P.A.W., Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strain of
476 *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*,
477 *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish. Dis.* 18, 93-96.

478 Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J. 2010. Diversity and
479 pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Env. Microbiol. Rep.* 2, 34-
480 43.

RESULTADOS

- 481 Beleneva, I.A., Zhukova, N.V., Maslennikova, E.F. 2003. Comparative study of
482 microbial communities from cultures and natural populations of the mussel *Mytilus*
483 *trossulus* in Peter the Great Bay. Microbiol. 72, 472-477.
- 484 Bergh, Ø., Strand, Ø. 2001. Great scallop, *Pecten maximus*, research and culture
485 strategies in Norway: a review. Aquacult. Int. 9, 305-318.
- 486 Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., Roque d'Orbcastel, E., Vadstein, O.
487 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication.
488 Aquac. Eng. 53, 30-39.
- 489 Buck, J.D. 1982. Non staining (KOH) method for determination of gram reactions of
490 marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 44, 992-993.
- 491 Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Stabili, L. 2009. Culturable heterotrophic bacteria in
492 seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian
493 Sea-Italy). Environ. Monit. Assess. 149, 465-475.
- 494 Chávez, P. and Riquelme, C. (1994). Análisis de la calidad bacteriológica en
495 reproductores de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) para su uso en acuicultura.
496 *Rev Latinoam Acuicultura* 43: 96-99.
- 497 D'Alvise, P.W., Melchiorson, J., Prsby, C.H., Nielsen, K.F., Gram, L. 2010. Inactivation
498 of *Vibrio anguillarum* by attached and planktonic *Roseobacter* cells. Appl. Environ.
499 Microbiol. 76, 2366-2370.
- 500 Diéguez, A.L., Jacobsen, A., Magnesen, T., Romalde, J.L. 2015. *Sinobacterium*
501 *norvegicum* sp. nov., isolated from great scallop (*Pecten maximus*) broodstock and
502 emended description of *Sinobacterium caligoides*. Antonie van Leeuwenhoek 108, 983-
503 991.
- 504 Diéguez, A.L., Balboa, S., Magnesen, T., Romalde, J.L. 2017a. *Neptuniibacter*
505 *pectenicola* sp. nov. and *Neptuniibacter marinus* sp. nov., two novel species isolated

RESULTADOS

- 506 from a Great scallop (*Pecten maximus*) hatchery in Norway and emended description
507 of the genus *Neptuniibacter*. Syst. Appl. Microbiol. 40, 80-85.
- 508 Diéguez, A.L., Balboa, S., Magnesen, T., Romalde, J.L. 2017b. *Arcobacter*
509 *lekithochrous* sp. nov., a new species isolated from a molluscan hatchery in Norway.
510 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67, 1327-1332.
- 511 Dubert, J., da Costa, F., Aranda-Burgos, J.A., Martínez-Patiño, T., Prado, S., Barja,
512 J.L. 2016. Beneficial effects of carpet Shell clam (*Ruditapes decussatus*) depuration
513 during short periods of conditioning in shellfish hatchery: Role of the temperature and
514 phytoplankton on reduction and diversity of vibrios. Aquaculture 459, 65-72.
- 515 Egan, S., James, S., Holmström, C., Kjelleberg, S. 2002. Correlation between
516 pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicate*.
517 Environ. Microbiol. 4, 433-442.
- 518 Elston, R. 1989. Bacteriological Methods for Diseased Shellfish, in: Austin, B., Austin,
519 D.A. (Eds), Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. Ellis
520 Horwood Limited, England, pp. 187-215.
- 521 FAO (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and
522 Aquaculture Information and Statistics Service, Rome; Italy. ([www.fao.org](http://www.fao.org/fishery/facp/NOR/en)
523 /fishery/facp/NOR/en)
- 524 Godoy, F.A., Espinoza, M., Wittwer, G., Uriarte, I., Aranda, C. 2011. Characterization of
525 culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*.
526 Cienc. Mar. 37, 339-348.
- 527 Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. 2000. The use and selection of probiotic
528 bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191, 259-270.

RESULTADOS

- 529 Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T. 1999. Inhibition of
530 *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of
531 fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 969-973.
- 532 Grossart, H-P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., Brinkhoff, T. 2005. Marine diatom
533 species harbor distinct bacterial communities. Environ. Microbiol. 7, 860-873.
- 534 Gruffyd, L.D., Beamont, A.R. 1970. Determination of the optimum concentration of
535 eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus*.
536 Helgoländer Wiss Meeresunters 20, 486-497.
- 537 Hess-Erga, O-K., Attramadal, K.J.K., Vadstein, O. 2008. Biotic and abiotic particles
538 protect marine heterotrophic bacteria during UV and ozone disinfection. Aquat. Biol. 4,
539 147-154.
- 540 Hess-Erga, O-K., Blomvågnes-Bakke, B., Vadstein, O. 2010. Recolonization by
541 heterotrophic bacteria after UV irradiation or ozonation of seawater; a simulation of
542 ballast water treatment. Water Res. 44, 5439-5449.
- 543 Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. 2006. Inactivation credit of UV
544 radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. Water Res.
545 40, 3-22.
- 546 Hold, G.L., Smith, E.A., Rappé, M.S., Maas, E.W., Moore, E.R.B., Stroempl, C.,
547 Stephen, J.R., Prosser, J.I., Birkbeck, T.H., Gallacher, S. 2001. Characterisation of
548 bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium*
549 spp. and *Scrippsiella trochoidea*. FEMS Microbiol. Ecol. 37, 161-173.
- 550 Holmström, C., Kjelleberg, S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated
551 with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS
552 Microbiol. Ecol. 30, 285-293.

RESULTADOS

- 553 Holmström, C, Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S. 2002. Antifouling
554 activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS
555 Microbiol. Ecol. 41, 47-58.
- 556 Hugh, R., Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus
557 oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. J. Bacteriol. 66,
558 24–26.
- 559 Jasti, S., Sieracki, M.E., Poulton, N.J., Giewat, M.W., Rooney-Varga, J.N. 2005.
560 Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium*
561 spp. and other phytoplankton. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3483-3494.
- 562 Jeffries, V.E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and
563 *Ostrea edulis*. Aquaculture 29, 201-266.
- 564 Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee,
565 J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA
566 gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J.
567 Syst. Evol. Microbiol. 62, 716-721.
- 568 Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V. 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from
569 brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). Bull. Eur. Ass.
570 Fish Pathol. 19, 102-106.
- 571 Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.
572 (Eds). Nucleic acids techniques in bacterial systematic, Chichester, Wiley, pp. 115-148.
- 573 Lasa, A., Mira, A., Camelo-Castillo, A., Belda-Ferre, P., Romalde, J.L. 2016.
574 Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-
575 pyrosequencing. Int. Microbiol. 19, 93-99.

RESULTADOS

- 576 Lemos, M.L., Toranzo, A.E., Barja, J.L. 1985. Modified medium for the oxidation-
577 fermentation test in the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49,
578 1541–1543.
- 579 Leyton, Y.E., Riquelme, C.E. 2008. Use of specific bacterial-microalgal biofilms for
580 improving the larval settlement of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) on three
581 types of artificial spat-collecting materials. Aquaculture 276, 78-82.
- 582 Liltved, H. 2002. Ozonation and UV-irradiation, in: Timmons, M.B., Ebeling, J.M.,
583 Wheaton, F.W., Summerfelt, S.T., Vinci, B.J. (Eds.), Recirculating Aquaculture
584 Systems. Second Ed. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY.
- 585 Magnesen, T., Bergh, Ø., Christophersen, G. 2006. Yields of great scallop, *Pecten*
586 *maximus*, larvae in a commercial flow-through rearing system in Norway. Aquacult. Int.
587 14, 377-394.
- 588 Magnesen, T., Jacobsen, A. 2012. Effect of water recirculation on seawater quality and
589 production of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Aquacult. Eng. 47, 1-6.
- 590 Magnesen, T., Jacobsen, A., Moepi, M.H. 2013. Effect of different filter methods on
591 seawater quality at a marine scallop hatchery. J. Aquac. Res. Development. 4:2. doi:
592 10.4172/2155-9546.10000168.
- 593 Masser, M.P., Rakocy, J., Losordo, T.M. 1999. Recirculating aquaculture tank
594 production systems: Management of recirculating systems. SRAC Pub. SRAC-452.
- 595 Michaud, L., Blancheton, J. P., Bruni, V., Piedrahita, R. 2006. Effect of particulate
596 organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in
597 biological filters. Aquacult. Eng. 34, 224-233.
- 598 Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., Blancheton, J.P.
599 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities

RESULTADOS

- 600 inhabiting a marine recirculating aquaculture system. J. Appl. Microbiol. 107, 1935-
601 1946.
- 602 Natrah, F.M.I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F.Md., Defoirdt, T. 2013. Significance
603 of microbial-bacterial interactions for aquaculture. Rev. Aquacult. 5, 1-14.
- 604 Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D. 1996. Bacterial problems
605 associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. Dis. Aquat. Organ. 27, 67-76.
- 606 Nicolas, J.L., Corre, S., Cochard, J.-C. 2004. Bacterial population association with
607 phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. Microb. Ecol. 48, 400-413.
- 608 Noguerola, I., Blanch, A.R. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous
609 keys. J. Appl. Microbiol. 105, 175-185.
- 610 Ortigosa, M., Garay, E., Pujalte, M.J. 1995. Numerical taxonomy of aerobic, Gram-
611 negative bacteria associated to oyster and surrounding seawater in Mediterranean
612 coast. Syst. Appl. Microbiol. 17, 588-600.
- 613 Prado, S., Montes, J., Romalde, J.L., Barja, J.L. 2009. Inhibitory activity of *Phaeobacter*
614 strains against aquaculture pathogenic bacteria. Int. Microbiol. 12, 107-114.
- 615 Prol-García, M.J., Pintado, J. 2013. Effectiveness of probiotic *Phaeobacter* bacteria
616 grown in biofilters against *Vibrio anguillarum* infections in the rearing of turbot (*Psetta*
617 *maxima*) larvae. Mar. Biotechnol. 15, 726-738.
- 618 Pujalte, M.J., Ortigosa, M., Macián, M.C., Garay, E. 1999. Aerobic and facultative
619 anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater.
620 Int. Microbiol. 2, 259-266.
- 621 Qian, P.-Y., Lau, S.C.K., Dahms, H.-U., Dobretsov, S., Harder, T. 2007. Marine biofilms
622 as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling
623 and aquaculture. Mar. Biotechnol. 9, 399-410.

RESULTADOS

- 624 Riquelme, C., Chavez, P., Morales, Y., Hayashida, G. 1994. Evidence for parental
625 bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Biol. Res. 27,
626 129-134.
- 627 Riquelme, C., Hayashida, G., Vergara, N., Vasquez, A., Morales, Y., Chavez, P.
628 1995a. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in
629 Chile. Aquaculture 138, 49-60.
- 630 Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A.E., Vilches, J., Chavez, P. 1995b.
631 Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (var) strain causing an epizootic
632 in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. Dis. Aquat. Organ. 22, 135-141.
- 633 Riquelme, C., Avendaño-Herrera, R. 2003. Interacción bacteria-microalga en el
634 ambiente marino y uso potencial en acuicultura. Rev. Chil. Hist. Nat. 76, 725-736.
- 635 Rojas, R., Miranda, C.D., Opazo, R., Romero, J. 2015. Characterization and
636 pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of
637 commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819).
638 J. Invertebr. Pathol. 124, 61-69.
- 639 Romalde, J.L., Barja, J.L. 2010. Bacteria in mollusks: good and bad guys, in: Méndez-
640 Vilas, A. (Ed.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied
641 Microbiology and Microbial Technology. Microbiology Book Series Vol. 2. Formatex
642 Research Center, Badajoz, Spain, pp. 136-147.
- 643 Romalde, J.L., Prado, S. 2011. Enfermedades bacterianas de moluscos bivalvos, in:
644 Observatorio Español de Acuicultura (Ed.), Enfermedades bacterianas de moluscos
645 bivalvos de interés en acuicultura, pp, 95-146.
- 646 Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sánchez, J.L., Nicolas, J.L. 1999. The benefit of a
647 *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. Mar. Biotechnol. 1, 52-59.

RESULTADOS

- 648 Sandaa, R.-A., Magnesen, T., Torkildsen, L., Bergh, Ø. 2003. Characterisation of the
649 bacterial community associated with early stages of Great Scallop (*Pecten maximus*),
650 using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Syst. Appl. Microbiol. 26, 302-
651 311.
- 652 Sandaa, R.-A., Brunvold, L., Magnesen, T., Bergh, Ø. 2008. Monitoring the
653 opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten*
654 *maximus* hatchery. Aquaculture 276, 14-21.
- 655 Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K. 2010. Microbial diversity of biological filters in
656 recirculating aquaculture systems. Curr. Opin. Biotechnol. 21, 318-325.
- 657 Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine
658 and mechanisms of resistance. Vet. Res. 32, 201-225.
- 659 Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersall-Sheldrake, A.R., Miller, K.M. 2006. Bacterial
660 diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic
661 bacterial strains. Aquaculture 256, 50-73.
- 662 Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T., Bullock, G.L., Gleason, L.E., Taeuber, J. 2005.
663 Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture
664 system. Aquacult. Eng. 33, 135-149.
- 665 Sich, H., van Rijn, J. 1992. Distribution of bacteria in a biofilter-equipped, semi-closed
666 intensive fish cultura system, in: Moav, B., Hilge, V., Rosenthal, H. (Eds.), Progress in
667 Aquaculture Research, Spec Publ No. 17, European Aquaculture Society, Bredene,
668 Belgium, pp, 55-78.
- 669 Skjermo, J., Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing
670 of marine larvae. Aquaculture 177, 333-343.

RESULTADOS

- 671 Smith, P., Davey, S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas*
672 *salmonicida* from fish with stress inducible furunculosis by a fluorescent *Pseudomonas*.
673 J. Fish Dis. 16, 521-524
- 674 Statistics Norway. www.ssb.no
- 675 Strand, Ø, Vølstad, J.H. 1997. The molluscan fisheries and culture of Norway. U.S.
676 Department of Commerce, NOAA Technical Report NMFS 129, 7-24.
- 677 Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T., Deguchi, Y. 1981. Bacterial flora of coastal
678 bivalves. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,: 655-661.
- 679 Sugita, H., Nakamura, H., Shimada, T. 2005. Microbial communities associated with
680 filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. Aquaculture 243,
681 403-409.
- 682 Torkildsen, L., Coyne, R., Samuelsen, O.B., Magnesen, T., Bergh, Ø. 2002. Treatment
683 of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents;
684 searching for an alternative to chloramphenicol. Aquacult. Int. 10, 399-402.
- 685 Torkildsen, L., Magnesen, T. 2004. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten*
686 *maximus*) -survival in different rearing systems. Aquacult. Int. 12, 489-507.
- 687 Tubiash, H.S., Chanley, P.E., Leifson, E. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval
688 and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. J. Bacteriol. 90, 1036-
689 1044.
- 690 van Rijn, J. 1996. The potential for integrated biological treatment systems in
691 recirculating fish culture. A review. Aquaculture 139, 181-201.
- 692 Vynne, N.G., Månsson, M., Nielsen, K.F., Gram, L. 2011. Bioactivity, chemical profiling
693 and 16S rRNA-based phylogeny of *Pseudoalteromonas* strains collected on a global
694 research cruise. Mar. Biotechnol. 13, 1062-1073.

RESULTADOS

- 695 Wassnig, M., Southgate, P.C. 2012. Effects of settlement cues on behavior and
696 substrate attachment of hatchery reared winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae.
697 Aquaculture 344-349, 216-222.
- 698 Wu, Y., Clevenger, T., Deng, B. 2005. Impacts of goethite particles on UV disinfection
699 of drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4140-4143.
- 700 Zhao, B., Zhang, S., Qian, P.-Y. 2003. Larval settlement of the silver- or goldlip pearl
701 oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues.
702 Aquaculture 220, 883-901.
- 703
- 704

Table 1: Bacteria present in broodstock gonad before and after spawning.

Compartment	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
			Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Broodstock	before spawning	40	<i>Vibrio tubiashii</i> ^{abc} (12.5)	<i>Sinobacterium</i> ^a (22.5)
			<i>V. fortis</i> ^{abcd} (10)	<i>Kordia</i> ^a (7.5)
			<i>V. pelagius</i> ^{ac} (10)	<i>Ruegeria</i> ^{af} (5)
			<i>V. splendidus</i> ^{acdef} (7.5)	<i>Paracoccus</i> (2.5)
			<i>V. agarivorans</i> (2.5)	<i>Pseudomonas</i> ^a (2.5)
				<i>Psychrobacter</i> ^a (2.5)
				<i>Brevundimonas</i> (2.5)
				<i>Shewanella</i> ^{abcde} (2.5)
				<i>Microbulbifer</i> ^a (2.5)
				<i>Thalassomonas</i> ^{af} (2.5)
				<i>Marinobacter</i> ^{ef} (2.5)
				<i>Roseovarius</i> (2.5)
Broodstock	after spawning	35	<i>V. pelagius</i> ^{ac} (25.7)	<i>Sinobacterium</i> ^a (11.4)
			<i>V. fortis</i> ^{abcd} (5.7)	<i>Tenacibaculum</i> (11.4)
			<i>V. splendidus</i> ^{acdef} (2.9)	<i>Thalassomonas</i> ^a (11.5)
			<i>V. tubiashii</i> ^{ac} (2.9)	<i>Pseudomonas</i> ^a (5.7)
			<i>V. orientalis</i> (2.9)	<i>Microbulbifer</i> ^a (2.9)
				<i>Ruegeria</i> ^{af} (2.9)
				<i>Shewanella</i> ^{abcde} (2.9)
				<i>Sulfitobacter</i> ^{ef} (2.9)
				<i>Colwellia</i> ^{bcde} (2.9)
				<i>Kordia</i> ^a (2.9)
				<i>Psychrobacter</i> ^a (2.9)

^a Genera common to broodstock before and after spawning.
^b Genera common to broodstock and larvae in RAS.
^c Genera common to broodstock and larvae in FTS.
^d Genera common to broodstock and water in FTS.
^e Genera common to broodstock and water in RAS.
^f Genera common to broodstock and microalgae.

Table 2: Bacterial genera present in larvae in RAS and FTS at different times in the cycle.

Compartment	System	Day	Nº Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Larvae	RAS	3	12	<i>Vibrio</i> <i>gigantis</i> ^{ab} (25)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abod} (25)
				<i>V. mediterranei</i> (8.3)	<i>Neptunibacter</i> ^{ab} (16.7)
					<i>Shewanella</i> ^{ac} (8.3)
					<i>Croceibacter</i> ^a (8.3)
					<i>Alteromonas</i> ^g (8.3)
	FTS	10	4	<i>V. chagasii</i> (50)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{bdef} (25)
					<i>Shewanella</i> ^{bod} (25)
		17	4	<i>V. fortis</i> ^c (50)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{ab} (25)
					<i>Colwellia</i> (25)
		3	11	<i>V. gigantis</i> ^{ac} (18.2)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abod} (27.3)
					<i>Neptunibacter</i> ^{ac} (18.2)
Larvae	RAS	10	4	<i>V. splendidus</i> ^c (50)	<i>Shewanella</i> ^{ab} (18.2)
					<i>Croceibacter</i> ^a (9.1)
					<i>Arcobacter</i> ^b (9.1)
					<i>Neptunibacter</i> ^b (25)
					<i>Colwellia</i> ^c (25)
	FTS	17	3	<i>V. pelagius</i> (33.3)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{ab} (33.3)
					<i>V. corallilyticus</i> (33.3)

^a Genera common to larvae in RAS and FTS at the same time.
^b Genera common to larvae and water in the same system and at the same time.
^c Genera common to larvae and biofilm in the same system and at the same time.
^d Genera common to larvae and water and biofilm in the same system at the same time.
^e Genera common to larvae and UV treated water in RAS at the same time.
^f Genera common to larvae and UV treated water and water in RAS at the same time.
^g Genera common to larvae and microalgae at the same time.

Table 3: Bacterial genera present in water in RAS and FTS at different times in the cycle.

Compartment	System	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Water	RAS	3	6		<i>Neptuniibacter</i> ^b (66.7)
					<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abcd} (16.7)
					<i>Phaeobacter</i> ^f (16.7)
		10	4	<i>V. fortis</i> ^c (14.3)	<i>Neptuniibacter</i> ^{aeaf} (28.6)
					<i>Pseudoalteromonas</i> ^{big} (14.3)
					<i>Shewanella</i> ^{bc} (14.3)
	FTS	17	4	<i>V. atlanticus/tasmaniensis</i> ^a (25) <i>V. splendidus</i> ^{ac} (25)	<i>Sulfobacter</i> ^e (14.3)
					<i>Colwellia</i> ^{af} (14.3)
					<i>Marinomonas</i> ^f (25)
					<i>Paraglutaccola</i> ^e (25)
					<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abcd} (22.2)
		3	9	<i>V. splendidus</i> (11.1)	<i>Arcobacter</i> ^b (22.2)
					<i>Shewanella</i> ^b (11.1)
					<i>Colwellia</i> (11.1)
					<i>Olleya</i> (11.1)
					<i>Colwellia</i> ^{ab} (33.3)
	10	4	4	<i>V. tubiashii</i> (16.7)	<i>Neptuniibacter</i> ^{ab} (16.7)
					<i>Alteromonas</i> ^b (16.7)
					<i>Polaribacter</i> (16.7)
					<i>Pseudoalteromonas</i> ^b (25)
					<i>Marinobacter</i> ^h (25)
	17	3	3	<i>V. atlanticus/tasmaniensis</i> ^a (25) <i>V. splendidus</i> ^{ac} (25)	

^a Genera common to water in RAS and FTS at the same time.
^b Genera common to water and larvae in the same system and at the same time.
^c Genera common to water and biofilm in the same system and at the same time.
^d Genera common to water and larvae and biofilm in the same system at the same time.
^e Genera common to water and biofilter in RAS at the same time.
^f Genera common to water and UV treated water in RAS at the same time.
^g Genera common to water and larvae and UV treated water in RAS at the same time.
^h Genera common to water and microalgae at the same time

RESULTADOS

Table 4: Genera present in biofilm in RAS and FTS at different times in the cycle.

Compartment	System	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Biofilm	RAS	3	5	<i>Vibrio gigantis</i> ^{abc} (20)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abcd} (20)
				<i>V. chagasii</i> ^a (20)	<i>Shewanella</i> ^c (20)
		10	5		<i>Aestuariibacter</i> (20)
				<i>V. splendidus</i> ^a (40)	<i>Shewanella</i> ^{bcd} (20)
				<i>V. hepatarius</i> (20)	
	FTS	17	5	<i>V. fortis</i> ^{ab} (20)	
				<i>V. splendidus</i> ^{abf} (60)	<i>Neptuniibacter</i> ^{ae} (20)
		3	7	<i>V. fortis</i> ^c (20)	
				<i>V. chagasii</i> ^a (42.9)	<i>Pseudoalteromonas</i> ^{abcd} (14.2)
				<i>V. gigantis</i> ^{ac} (14.2)	<i>Neptuniibacter</i> ^c (14.2)
		10	4	<i>Paraglaeicola</i> (14.2)	
				<i>V. splendidus</i> ^{ac} (75)	
		17	4	<i>V. fortis</i> ^a (25)	
				<i>V. splendidus</i> ^{abf} (25)	<i>Neptuniibacter</i> ^a (25)
				<i>V. hemiicentrolis</i> (25)	
				<i>V. chagasii</i> (25)	

^a Genera common to biofilm in RAS and FTS at the same time.

^b Genera common to biofilm and water in the same system and at the same time.

^c Genera common to biofilm and larvae in the same system and at the same time.

^d Genera common to biofilm and water and larvae in the same system at the same time.

^e Genera common to biofilm and biofilter in RAS at the same time.

^f Genera common to biofilm and microalgae at the same time.

Table 5: Genera present in microalgae in RAS/FTS at different times in the cycle.

Compartment	System	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Microalgae	RAS/FTS	3	7		<i>Alteromonas</i> ^a (28.6)
					<i>Sulfitobacter</i> (14.3)
					<i>Ruegeria</i> (14.3)
					<i>Marinobacter</i> ^c (14.3)
					<i>Muricauda</i> (14.3)
		10	2		<i>Jejuia</i> (14.3)
					<i>Marinobacter</i> (50)
					<i>Alteromonas</i> ^{bc} (50)
		17	4		<i>Marinobacter</i> ^b (25)
				<i>Vibrio splendidus</i> ^{bd} (25)	<i>Phaeobacter</i> (25)
					<i>Sulfitobacter</i> (25)

^a Genera common to microalgae and larvae at the same time.
^b Genera common to microalgae and water at the same time.
^c Genera common to microalgae and UV treated water at the same time.
^d Genera common to microalgae and biofilm at the same time.

Table 6: Genera present in biofilter in RAS at different times in the cycle.

Compartment	System	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
Biofilter	RAS	3	2	<i>Vibrio pelagius</i> (100)	
		10	2		<i>Neptuniibacter</i> ^{bd} (50) <i>Sulfitobacter</i> ^b (50)
		17	6		<i>Alteromonas</i> (33.4) <i>Neptuniibacter</i> ^c (16.7) <i>Aestuariibacter</i> (16.7) <i>Paraglaciecola</i> ^b (16.7) <i>Colwellia</i> ^a (16.7)

^a Genera common to biofilter and larvae in RAS at the same time.
^b Genera common to biofilter and water in RAS at the same time.
^c Genera common to biofilter and biofilm in RAS at the same time.
^d Genera common to biofilter and UV treated water in RAS at the same time.

Table 7: Genera present in water treated with UV light in RAS at different times in the cycle.

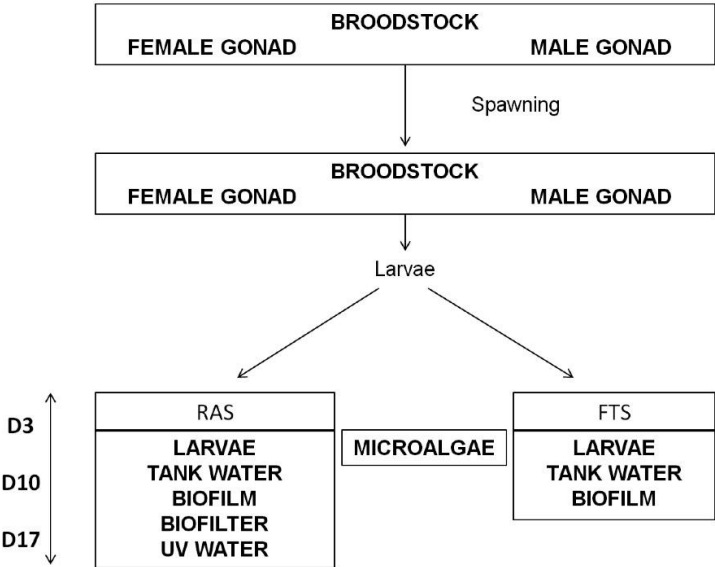
Compartment	System	Day	N° Morphotypes	Identification (%)	
				Fermentative bacteria	Oxidative bacteria
UV water	RAS	3	3		<i>Phaeobacter</i> ^b (66.7)
					<i>Marinobacter</i> ^d (33.3)
	RAS	10	5		<i>Pseudoalteromonas</i> ^{ab} (20)
					<i>Colwellia</i> ^b (20)
					<i>Alteromonas</i> ^d (20)
					<i>Neptuniibacter</i> ^{bc} (20)
					<i>Pseudomonas</i> (20)
	RAS	17	2		<i>Pseudoalteromonas</i> ^a (50)
					<i>Marinomonas</i> ^b (50)

^a Genera common to UV treated water and larvae in RAS at the same time.
^b Genera common to UV treated water and water in RAS at the same time.
^c Genera common to UV treated water and biofilter in RAS at the same time.
^d Genera common to UV treated water and microalgae in RAS at the same time.

RESULTADOS

Figure legends

Figure 1. Diagram of compartments and experimental samplings carried out in the both systems.



3.2. Caracterización y descripción de nuevos taxones



3.2.1. *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., isolated from Great scallop (*Pecten maximus*) broodstock and emended description of *Sinobacterium caligoides*

Diéguez, A.L., Jacobsen, A., Magnesen, T. y Romalde, J.L.

Anton. Leeuw. Int. J. G., 108: 983-991, 2015.

Índice de impacto: 1,94; Q3 en Microbiology.

En un criadero de vieira (*Pecten maximus*) en Bergen, Noruega, se aislaron seis cepas a partir de gónadas de reproductores. Estos aislados se caracterizaron completamente mediante un enfoque polifásico. El análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr indicó que estaban relacionados con el género *Sinobacterium*, mostrando una similitud entre 96,97-97,63% con la única especie del género, *Sinobacterium caligoides*. La caracterización fenotípica mostró que estas cepas eran halófilas, Gram negativas, quimiorganotrofos aerobios y permitieron diferenciarlas de los taxones cercanos. El contenido G+C de los nuevos aislados fue de $52,2 \pm 1$ mol% y los ácidos grasos predominantes fueron C_{16:0}, C_{16:1 ω 7c}/ C_{16:1 ω 6c} y C_{18:1 ω 7c}. El valor de la hibridación ADN-ADN entre la cepa 3CM4^T y la cepa tipo de *S. caligoides* LMG 25705^T fue del 46%. Los valores de hibridación entre la cepa 3CM4^T y el resto de aislados de vieira oscilaron entre 82 y 93,6%. En base a los resultados obtenidos, los seis aislados de vieira representaron una nueva especie en el género *Sinobacterium*, para la cual se propuso el nombre de *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., con la cepa 3CM4^T (CECT 8267^T=CAIM 1884^T) como cepa tipo.



RESULTADOS

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10482-015-0551-y>



3.2.2. *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. and *Neptuniibacter marinus* sp. nov., two novel species isolated from a Great scallop (*Pecten maximus*) hatchery in Norway and emended description of the genus *Neptuniibacter*

Diéguez, A.L., Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L.

Syst. Appl. Microbiol., 40: 80-85, 2017.

Índice de impacto: 3,93; Q1 en Microbiology.

Nueve aislados obtenidos de un criadero de vieira en Noruega se caracterizaron mediante un enfoque polifásico. Los aislados fueron Gram negativos, aerobios y bacilos móviles con metabolismo oxidativo. El análisis filogenético realizado en base a las secuencias de los genes 16S ARNr y *rpoB* mostró que las cepas formaban dos grupos diferentes asociados con miembros del género *Neptuniibacter*. La hibridación ADN-ADN *in silico* (eDDH) y el promedio de identidad nucleotídica (ANI) demostraron que los aislados constituían dos nuevas especies de este género, los cuales pudieron diferenciarse fenotípicamente de los taxones más próximos por diversas características como la presencia de catalasa o gelatinasa, entre otras. Se propusieron los nombres de *Neptuniibacter marinus* sp. nov. y *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov., con ATR 1.1^T (=CECT 8938^T=DSM 100783^T) y LFT 1.8^T (=CECT 8936^T=DSM 100781^T) como cepas tipo, respectivamente.



RESULTADOS

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202016301370?via%3Dihub>



3.2.3. Draft Genome Sequences of *Neptuniibacter* sp. Strains LFT 1.8 and ATR 1.1

Diéguez, A.L. y Romalde, J.L.

Genome Announc., 5 (5): e01541-16, 2017.

Revista Open Access: American Society for Microbiology.

En este trabajo presentamos el borrador de los genomas de las cepas LFT 1.8 (CECT 8936=DSM 100781) y ATR 1.1 (CECT 8938=DSM 100783), cepas tipo de las especies *Neptuniibacter pectenicola* y *N. marinus*, respectivamente. La anotación de estos genomas reveló la presencia de 70 secuencias codificantes relacionadas con la resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos, como el arsénico y el mercurio. Además, ambas cepas presentaron genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos y la cepa LFT 1.8, a diferencia de ATR 1.1, cuenta en su genoma con secuencias CRISPR.



RESULTADOS

<http://genomea.asm.org/content/5/5/e01541-16>



3.2.4. *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery

Diéguez, A.L., Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 67: 1327-1332, 2017.

Índice de impacto: 2,13; Q3 en Microbiology.

Cuatro cepas bacterianas, LFT 1.7^T, LT2C 2.5, LT4C 2.8 y TM 4.6, se aislaron de larvas de vieira (*Pecten maximus*) y agua de tanque en un criadero noruego y se caracterizaron mediante una aproximación polifásica, incluyendo la determinación de las características fenotípicas, quimiotaxonómicas y genómicas. Todos los aislados fueron bacilos móviles, Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos y necesitaron sales marinas para crecer. Los ácidos grasos mayoritarios que presentaron fueron Summed Feature 3 (C_{16:1}Ω_{7c}/ C_{16:1}Ω_{6c}), Summed Feature 8 (C_{18:1}Ω_{7c} o C_{18:1}Ω_{6c}), C_{16:0}, C_{14:0}, Summed Feature 2 (C_{14:0} 3-OH/iso-C_{16:1} I), C_{12:0} 3-OH y C_{12:0}. La cepa LFT 1.7^T presentó una única quinona respiratoria, la menaquinona MK-6. El análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr indicó que todas las cepas formaban un linaje distinto en el género *Arcobacter* con un bajo porcentaje de similitud con especies conocidas (94,77-95,32%). El contenido G+C fue de 28,7 mol%. Los resultados de la hibridación ADN-ADN *in silico* junto con los del promedio de identidad nucleotídica (ANI) confirmaron que los aislados constituían una nueva especie de *Arcobacter*, para la cual se propuso el nombre de *Arcobacter lekithochrous* sp. nov. La cepa tipo fue LFT 1.7^T (=CECT 8942^T=DSM 100870^T).



RESULTADOS

<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001809#tab2>



3.2.5. Complete Genome Sequence of *Arcobacter* sp. Strain LFT 1.7 Isolated from Great Scallop (*Pecten maximus*) Larvae

Diéguez, A.L. y Romalde, J.L.

Genome Announc., 5 (6): e01617-16, 2017.

Revista Open Access: American Society for Microbiology.

La cepa LFT 1.7, cepa tipo de *Arcobacter lekithochrous*, se seleccionó para la secuenciación completa de su genoma con el fin de tratar de determinar su posición taxonómica y su función ecológica en el criadero. En este genoma se encontraron genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y otros con el estrés nitrosativo, además de secuencias codificantes para la resistencia a antibióticos o compuestos tóxicos.



RESULTADOS

<http://genomea.asm.org/content/5/6/e01617-16>



3.2.6. Complete characterization of new isolates of *Neptunomonas phycophila* leads to emend its description and opens possibilities of biotechnological applications

Diéguez, A.L., Pichon, P., Balboa, S., Magnesen, T. y Romalde, J.L.

MicrobiologyOpen, e519. doi: 10.1002/mbo3.519. 2017

Índice de impacto: 2,75; Q2 en Microbiology.

Se han aislado cinco cepas de gónadas de reproductores de vieira (*Pecten maximus*) en un criadero noruego. El estudio de las secuencias del gen 16S ARNr mostró que estos aislados pertenecían a *Neptunomonas phycophila*, una bacteria aislada originariamente de un simbiote de la anémona *Aiptasia tagetes* en Puerto Rico. Las secuencias de los genes *gyrB* y *rpoB* confirmaron la afiliación de los aislados de vieira a esta especie. Se realizó una caracterización fenotípica y se detectaron algunas diferencias entre los aislados noruegos y la cepa tipo de *N. phycophila*, como los rangos de temperatura, pH y tolerancia a distintas concentraciones de salinidad, así como en el uso de varios sustratos como única fuente de carbono, las cuales dieron lugar a la corrección en la descripción de la especie. La cepa 3CM2.5 presentó como lípidos polares principales fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol. Se obtuvieron los genomas completos de la cepa de vieira 3CM2.5 y la cepa tipo de la especie CECT 8716^T y la anotación de estos genomas reveló la presencia de genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos en ambas cepas. Los resultados obtenidos, no sólo ampliaron el rango geográfico y de hospedador de *N. phycophila*, sino que también

RESULTADOS

marcaron la posible aplicación biotecnológica de esta especie bacteriana.

RESULTADOS

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.519/abstract;jsessionid=C472E513AE EB439684DCAC017EB49458.f04t03?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+unavailable+on+Saturday+7th+Oct+from+03.00+EDT+%2F+08%3A00+BST+%2F+12%3A30+IST+%2F+15.00+SGT+to+08.00+EDT+%2F+13.00+BST+%2F+17%3A30+IST+%2F+20.00+SGT+and+Sunday+8th+Oct+from+03.00+EDT+%2F+08%3A00+BST+%2F+12%3A30+IST+%2F+15.00+SGT+to+06.00+EDT+%2F+11.00+BST+%2F+15%3A30+IST+%2F+18.00+SGT+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience+caused+>.



4. DISCUSIÓN GENERAL



La vieira *Pecten maximus* es un bivalvo con un alto valor comercial y de gran interés para la acuicultura europea. La mayoría de la vieira comercializada proviene de las capturas ya que los esfuerzos realizados en el desarrollo de nuevos métodos de cultivo todavía no han tenido mucho éxito. La tecnología utilizada en los criaderos no ha evolucionado mucho desde los años 70, siendo el sistema de flujo continuo (FTS) el más utilizado (Andersen y col., 2000), junto con el uso de antibióticos para evitar las altas mortalidades que se producen normalmente en la etapa larvaria y que tienen como consecuencia la pérdida de la producción. Pero la aparición de resistencias, así como la prohibición del uso de ciertos antibióticos en la Unión Europea en animales destinados al consumo humano, hacen necesario el avance de nuevas tecnologías que optimicen la producción de moluscos y el desarrollo de nuevas sustancias inhibitorias que eviten las infecciones causantes de estas mortalidades. Animados por los buenos resultados obtenidos con los sistemas de recirculación (RAS) en la acuicultura de peces (Bergheim y col., 2009), se ha aplicado esta tecnología a los criaderos de moluscos, aunque todavía de forma experimental, obteniendo resultados positivos para distintas especies de moluscos (Kamermans y col., 2016).

En un criadero hay múltiples nichos en los que las bacterias pueden establecerse. Hasta ahora, los estudios realizados se centran en las bacterias presentes en uno o dos compartimentos, pero no toman el criadero como un sistema múltiple donde se producen interacciones complejas, formando un ecosistema propio (Michaud y col., 2009; Blancheton y col., 2013). Además, al igual que la microbiota presente en un organismo puede influenciar su salud, las comunidades que se establecen en los criaderos podrían ser un factor clave en la mejora de la producción de las semillas. Otro factor clave es el conocimiento de las vías de entrada de las bacterias, especialmente

de los reproductores, que podría hacer posible el control y la optimización de la microbiota (Asmani y col., 2016). En esta memoria tratamos de determinar la microbiota cultivable presente y su evolución en los distintos compartimentos de un criadero en FTS y RAS a lo largo de un ciclo de producción de semilla. En estudios anteriores realizados en el mismo criadero, al igual que en este ciclo, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia de las larvas (Magnesen y col., 2013; Kamermans y col., 2016). Por lo que el sistema de recirculación podría ser una buena alternativa en la producción intensiva de moluscos en criadero en Noruega. Estudiamos la gónada de reproductores como una de las principales vías de entrada de microorganismos en el sistema. Se analizaron las muestras antes y después del desove y pudimos comprobar que en ambos casos las gónadas presentan una alta diversidad bacteriana. Además, el comportamiento de la microbiota asociada varía. Si bien es cierto que algunos de los géneros que encontramos están presentes tanto antes como después de la puesta, otros tan sólo aparecen en una de las situaciones. En ambos casos, aproximadamente un 40% de la microbiota está formada por representantes del género *Vibrio*. Este género está presente en mayor o menor medida en todos los compartimentos del criadero, excepto en el agua tratada con UV. Este tratamiento de esterilización, debido a la adherencia de los microorganismos a partículas más grandes que impiden que llegue a ellas la radiación o bien al desarrollo de mecanismos de reparación del ADN (Wu y col., 2005; Hess-Erga y col., 2008), no consigue eliminar totalmente las bacterias del agua, si no que más bien parece tener un efecto transformador de la microbiota, seleccionando el tipo de bacterias que se encuentran en el agua tratada (Hijnen y col., 2006; Asmani y col., 2016). Así, al igual que lo observado por Hess-Erga y col. (2010), el agua es colonizada por γ -*Proteobacteria* que desplazan a

DISCUSIÓN GENERAL

las *α -Proteobacteria* presentes inicialmente, provocando un cambio hacia una población más estable dominada por estrategias-K.

Otro de los géneros mayoritarios que aparecen asociados a la gónada es el género *Sinobacterium*. Este género, que permanece en este tejido tras el desove, podría formar parte de la microbiota residente de adultos de vieira ya que nunca se detecta en agua, larvas o microalgas. En este trabajo realizamos la descripción de los aislados pertenecientes a este género, ya que no podían asignarse a ninguna especie conocida y fueron denominados *Sinobacterium norvegicum* sp. nov. Inicialmente, este género se localizaba dentro de la familia *Oceanospirillaceae*, pero una reclasificación realizada por Spring y col. (2015) dio lugar a la descripción de un nuevo orden bacteriano, el orden *Cellvibrionales*, en base a las secuencias del gen *rpoB* y de proteomas, que engloba cinco nuevas familias entre ellas la familia *Songiibacteraceae* en la que incluyeron a este género. Además, clasificaron este grupo como estrategias-K, caracterizados por una elevada abundancia en ambientes oligotrofos y una tasa de crecimiento baja pero constante, con un metabolismo altamente especializado.

Un grupo de aislados exclusivos de gónada, analizados posteriormente, fueron identificados en base a la secuenciación del gen 16S ARNr como *Neptunomonas phycophila*, una especie descrita previamente por Frommlet y col. (2015), en base a una única cepa aislada de simbioses de la anémona *Aiptasia tagetes* en Puerto Rico. La importancia de estas cepas reside en que amplían el rango de hospedadores de esta especie, así como la distribución geográfica de la misma, desde el Caribe hasta el Mar del Norte. Los aislados de vieira y la cepa tipo de *N. phycophila* presentaron características diferenciales como la temperatura de crecimiento, el pH o la tolerancia a distintas concentraciones salinas, entre otras. La cepa tipo es capaz de crecer a

DISCUSIÓN GENERAL

40 °C con una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, mientras que las cepas noruegas sólo lo hacen hasta 37 °C con una temperatura óptima de 23 °C. Esta diferencia puede deberse a una adaptación de esta bacteria a las distintas condiciones climáticas en su origen geográfico (Chattopadhyay, 2006). Todas las diferencias fenotípicas observadas entre la única cepa conocida hasta el momento y nuestros aislados, así como la ampliación de los análisis realizados en esta especie, dieron lugar a la corrección de la descripción de la misma.

La especie tipo del género *Neptunomonas*, *N. naphthovorans*, se detectó por primera vez en sedimentos contaminados con creosota y está relacionada con la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). *Neptunomonas phycophila* no está aislada en suelos contaminados ni se describió originalmente como una bacteria degradadora de compuestos aromáticos, pero el análisis comparativo realizado de los genomas de la cepa tipo de esta especie CECT 8716^T, junto con una de las cepas procedentes de vieira 3CM2.5, demostraron la presencia en ambas de genes implicados en la degradación de catecol, principal intermediario en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos y en la degradación de compuestos cloroaromáticos como el clorofenol, entre otros, que se utilizan como materia prima en la fabricación de plaguicidas. Debido al creciente interés en el desarrollo de métodos microbiológicos para la purificación de aguas y suelos contaminados con este tipo de compuestos, la presencia de rutas activas en estas bacterias abre la puerta a un estudio en profundidad de la posible aplicación de estos microorganismos en biorremediación.

Por otra parte, el resto de bacterias presentes en las gónadas de reproductores pertenecen a distintos géneros con metabolismo oxidativo, distribuidos entre las clases γ -*Proteobacteria*, α -

Proteobacteria y *Flavobacteriia*, clases mayoritarias en la microbiota cultivable de moluscos o asociada a ambientes marinos. Este patrón se repite en los distintos compartimentos, en los que tras una colonización inicial por parte de estos 3 grupos, la tendencia es la colonización por parte de γ -*Proteobacterias*.

Cabría esperar que las poblaciones bacterianas asociadas a agua en los distintos sistemas fuesen diferentes, ya que los tratamientos de filtración y el alto flujo de agua en el sistema FTS puede hacer más difícil el establecimiento de las bacterias (Asmani y col., 2016), pero la evolución de las poblaciones presentes en agua en ambos sistemas es similar, llegando a estar colonizadas en los tiempos finales por γ -*Proteobacteria*. Es destacable la ausencia de vibrios en agua en RAS únicamente cuando bacterias del género *Phaeobacter* están presentes. Es ampliamente conocido el efecto inhibitorio que este grupo presenta frente a diferentes patógenos, entre ellos representantes del género *Vibrio* (Ruiz-Ponte y col., 1999; D'Alvise y col., 2010; Prol-García y Pintado, 2013). Lo que sí apreciamos es la influencia que tienen las comunidades bacterianas presentes en el agua en la microbiota de las larvas. Así, los géneros *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter*, *Colwellia*, *Vibrio* y *Shewanella* en ambos sistemas y *Arcobacter* en FTS, están presentes en ambos nichos al mismo tiempo.

Los representantes de los géneros *Neptuniibacter* y *Arcobacter* no pudieron asignarse a ninguna especie conocida, por lo que en esta memoria se recogen las descripciones como nuevas especies de todos estos aislados. Los aislados identificados como *Neptuniibacter* formaron dos grupos bien diferenciados. Uno de ellos está compuesto en exclusiva por aislados procedentes de larvas en ambos sistemas, y la especie se denominó *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. El otro

DISCUSIÓN GENERAL

grupo de aislados dentro de este género se distribuía de manera más heterogénea, encontrando aislados procedentes de agua en RAS, agua tratada con UV y biofiltro. Este grupo se denominó *Neptuniibacter marinus* sp. nov. *Neptuniibacter caesariensis*, la especie tipo de este género, presenta una alta capacidad para crecer en cultivos de agua marina con baja concentración en carbón orgánico y nutrientes (Pinhassi y Berman, 2003), es halófila, con requerimientos iónicos complejos para el crecimiento (Arahal y col., 2007) y capaz de utilizar taurina como única fuente de nitrógeno (Krejčík y col., 2008). Otras especies de este género han sido estudiadas debido a que presentan genes de degradación de carbazol (Nagashima y col., 2010), un compuesto considerado contaminante de agua y suelo (Riddle y col., 2003). Ambas especies descritas en esta memoria presentan genes de degradación de fenol, un contaminante presente en residuos de algunos procesos industriales. Se está estudiando la eliminación de este compuesto mediante el uso de bacterias, ya que es una solución eficaz y económica, abriendo la puerta al estudio del potencial uso de estos aislados como agentes en biorremediación.

Por otro lado, los aislados asignados al género *Arcobacter* se describieron en esta memoria como una nueva especie denominada *Arcobacter lekithochrous* sp. nov. Entre las 25 especies que componen este género actualmente, se encuentran importantes enteropatógenos humanos y animales. Esto ha dado lugar a numerosos estudios de prevalencia en diversos ambientes y animales como los moluscos, que pueden actuar como reservorio de distintos patógenos (Collado y col., 2008, 2009a; Ottaviani y col., 2013; Hsu y Lee, 2015; Mottola y col., 2016a, 2016b). Gracias a estos estudios se han identificado y descrito nuevos taxones en los últimos años (Collado y col., 2009b; Levican y col., 2012, 2013, 2015). En la actualidad, la similitud entre las secuencias del gen 16S rRNA de todas las especies conocidas de

DISCUSIÓN GENERAL

Arcobacter oscila entre el 91,20% y el 99,57%. En nuestro caso, los aislados de *A. lekithochrous* muestran una similitud del gen 16S rRNA del 94,77% con *A. nitrofigilis*, la especie tipo del género. Estos valores de similitud tan bajos podrían indicar que algunas de estas especies, entre las que se encuentra la nuestra, configurarían un nuevo género dentro de la familia *Campylobacteraceae*, por lo que es necesaria una profunda revisión taxonómica de este grupo bacteriano.

El análisis del genoma de esta nueva especie ayudó a determinar la función ecológica de esta bacteria en los distintos ambientes y a ampliar la heterogenicidad de este género. Este estudio reveló la presencia de genes implicados en la denitrificación y amonificación, por lo que esta bacteria estaría implicada en los ciclos biogeoquímicos del Nitrógeno. Además, estas bacterias presentan flavohemoglobinas que confieren protección frente al óxido nítrico segregado por los animales superiores como defensa ante una infección, aunque los aislados se obtuvieron de individuos sanos, que no presentaban ningún síntoma de infección.

Desde el punto de vista taxonómico, la identificación de nuevas especies bacterianas procedentes de ambientes marinos ha experimentado un aumento importante en los últimos años, aunque la calidad de las descripciones no ha seguido la misma evolución (Fournier y col., 2015). La mayoría de las descripciones están hechas a partir de un único aislado, con pobres caracterizaciones bioquímicas y moleculares en base a un único gen, el gen 16S ARNr (Roselló-Móra y Amann, 2001; Figueras y col., 2011). La tendencia actual es llevar la taxonomía hacia un enfoque puramente genómico. El avance de las técnicas de secuenciación masiva, así como el hecho de que cada vez son más asequibles para cualquier laboratorio, hace posible que las descripciones de nuevas especies se basen principalmente en el

DISCUSIÓN GENERAL

análisis de los genomas, utilizando técnicas como la hibridación ADN-ADN *in silico* (Auch y col., 2010a, 2010b; Meier-Kolthoff y col., 2013) o el ANI (por sus siglas en inglés: *Average Nucleotide Identity*) (Richter y Roselló-Móra, 2009) que permiten la diferenciación de especies con mucha más precisión (Whitman, 2015), aunque se ha podido comprobar que mucha de la información depositada en las bases de datos es errónea o presenta fallos (Fournier y col., 2015; Roselló-Móra y Amann, 2015). La dificultad en el cultivo de algunas de estas especies y la baja reactividad de las mismas da lugar a descripciones fenotípicas incorrectas o limitadas a pocos resultados. Se están desarrollando herramientas que permiten inferir las características fenotípicas de los microorganismos a partir de sus genomas (Brbić y col., 2016; Weimann y col., 2016) o analizar las rutas metabólicas completas que presentan (Moriya y col., 2013; Kanehisa y col., 2016). Todos estos avances hacen que sea imprescindible la revisión de los estándares establecidos para la descripción de nuevos taxones para adaptarlos a las nuevas tecnologías (Konstantinidis y col., 2006; Schleifer, 2009).

El comportamiento general de la microbiota analizada en este estudio en ambos sistemas es bastante similar. Aunque en líneas generales, no se puede establecer el origen, colonización o circulación de los microorganismos entre los diferentes compartimentos, se aprecian algunos patrones para determinadas especies como *V. fortis* y *Shewanella* en RAS o *V. splendidus* en FTS. Estas bacterias aparecen en las gónadas de los reproductores antes y después del desove tras el cual pasan a ser parte de la microbiota encontrada en larvas, agua y las biopelículas formadas en la superficie de tanques en las fases finales del experimento. Esto podría indicar una posible transmisión vertical desde los reproductores (Riquelme y col., 1994; Schulze y col., 2006; Sandaa y col., 2008; Dubert y col., 2016a).

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se pone de manifiesto la complejidad que representa un criadero. Los estudios relacionados con la producción de moluscos se han basado por una parte en el análisis y control de parámetros físico-químicos (salinidad, pH, temperatura, tipo de dieta, materia orgánica disuelta, etc) en los distintos compartimentos, tanto de forma individual como en conjunto, y su influencia en la supervivencia de las larvas en los diferentes sistemas de cría (Christophersen y col., 2003, 2006; Merino y col., 2009; Magnesen y col., 2013; Blanco-García, y col., 2015; Kamermans y col., 2016) y, por otro lado, en el estudio microbiológico individual de cada uno de los compartimentos que conforman el criadero o en la búsqueda de patógenos y probióticos (Araya y col., 1999; Nicolas y col., 2004; Cytryn y col., 2005; Auffret y col., 2013; Blancheton y col., 2013). Sin embargo, los criaderos son ecosistemas complicados y las interacciones que tienen lugar entre los distintos compartimentos son altamente complejas, por lo que es necesario integrar distintos estudios biológicos y físicos para comprender el proceso completo (Michaud y col., 2009; Blancheton y col., 2013). Estos estudios en los que se analiza la evolución y desarrollo de las poblaciones microbianas, el papel que juegan en los ciclos bioquímicos en el criadero, el control y manejo de bacterias perjudiciales o beneficiosas, las interacciones entre bacterias y fitoplancton, así como entre bacterias y los animales cultivados, son esenciales para obtener una visión general de las operaciones del criadero y optimizar los sistemas de producción.

Para comprender la ecología de cualquier comunidad, además de determinar las unidades ecológicas que la componen debemos conocer cuáles son las interacciones que tienen lugar entre ellas (Koeppel y col., 2008). El enorme número de especies bacterianas, así como de papeles ecológicos que realizan, junto con el hecho de que sólo podemos cultivar en el laboratorio una pequeñísima porción de

DISCUSIÓN GENERAL

estas poblaciones, hacen que el estudio de la microbiota que compone un sistema como un criadero de bivalvos sea una ardua tarea. Gracias al avance de las técnicas de biología molecular ahora se tiene un conocimiento más preciso de los microorganismos presentes en el medio natural y, a pesar de los sesgos introducidos por estos métodos moleculares, tenemos una mejor estimación de su abundancia relativa (Joint y col., 2010). Pero incluso en esta época de secuenciación masiva los cultivos de microorganismos siguen siendo indispensables. De ellos dependen la caracterización taxonómica y definición de nuevos taxones, el establecimiento de la fisiología de los microorganismos, el estudio de sus aplicaciones biotecnológicas o de su potencial infeccioso o el conocimiento de su papel en el ambiente, ecología o ciclos de nutrientes (Heidelberg y col., 2010; Stewar, 2012). Deducir la función potencial de las bacterias por los grupos a los que pertenecen es arriesgado, ya que estos grupos tienen miembros con diferentes funciones (Asmani y col., 2016). Por todo ello, el establecimiento de cultivos puros de representantes de todos los taxones bacterianos es uno de los mayores retos de la microbiología moderna (Giovannoni y Stingl, 2007; Joint y col., 2010; Austin, 2017).

5. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. El comportamiento general de la microbiota analizada en ambos sistemas fue bastante similar y no ha podido establecerse el origen, colonización o circulación de los microorganismos en el criadero, más allá de que sean comunes a 2 o 3 compartimentos. Las diferencias entre ambos sistemas fueron, en este estudio, irrelevantes.
2. Las gónadas de reproductores presentan una gran diversidad bacteriana que no se ve afectada de manera importante por el desove. Algunas de estas bacterias son exclusivas de estos órganos mientras que otras, como *V. fortis* y *Shewanella* en RAS y *V. splendidus* en FTS, parecen transmitirse a las larvas tras el desove, por lo que podríamos hablar de una transmisión vertical de estos microorganismos.
3. La microbiota de las larvas está fuertemente influenciada por la del agua en ambos sistemas, aunque esta relación es más fuerte en FTS, al presentar géneros comunes como *Vibrio*, *Neptuniibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia* y *Shewanella* y una evolución similar. El género *Vibrio* se mantiene en ambos compartimentos, al igual que en las biopelículas, donde constituye el 75-80% de las poblaciones microbianas y desplaza a géneros como *Pseudoalteromonas* o *Shewanella*. Solamente el género *Neptuniibacter* comparte este nicho con los vibrios al final del ciclo de producción en ambos sistemas.

CONCLUSIONES

4. Las microalgas constituyen una vía de entrada de microorganismos al sistema, aunque las poblaciones bacterianas presentes en este fitoplancton no permanecen en los compartimentos en ambos sistemas, por lo que no representan en este trabajo, un problema para la transmisión e introducción de patógenos en el criadero.
5. La microbiota cultivable detectada en el biofiltro aumenta a lo largo del ciclo de producción y llega a estar formada por una población heterogénea de bacterias, todas ellas con metabolismo oxidativo pero distinto comportamiento en la reducción de nitratos.
6. La caracterización polifásica de los diferentes aislados obtenidos en los distintos compartimentos del criadero permitió la descripción de cuatro nuevas especies: *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., *Neptuniibacter marinus* sp. nov., *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. y *Arcobacter lekithochrous* sp. nov.
7. El análisis genómico de los aislados de *Neptuniibacter* mostraron el potencial de estas bacterias en la degradación de compuestos aromáticos y su uso en biorremediación.
8. El estudio polifásico de las cepas identificadas como *Neptunomonas phycophila* ha dado lugar, además de a la ampliación del rango geográfico y de hospedador de esta especie, a la corrección de la descripción de la misma. Por otro lado, el análisis del genoma completo de estos aislados ha revelado el potencial de estas bacterias, al igual que otros miembros de este género, en la degradación de compuestos aromáticos.

CONCLUSIONES

9. Estos resultados sugieren que el sistema de recirculación podría ser una buena alternativa en la producción intensiva de moluscos en criadero, aunque son necesarios más estudios en profundidad que combinen los procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar en un sistema de producción e integren todas las interacciones que se producen entre los compartimentos del criadero.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J.M. y Saucedo, P.E. (2009). Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture* 296: 255-262. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.08.028.
- Aguilar-Macías, O.L., Ojeda-Ramírez, J.J., Campa-Córdova, A.I. y Saucedo, P.E. (2010). Evaluation of natural and comercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *J.World. Aquacult. Soc.* 41: 447-454. doi:10.1111/j.1749-7345.2010.00386.x.
- Andersen, S., Burnell, G. y Bergh, Ø. (2000). Flow-through systems for culturing Great scallop larvae. *Aquacult. Int.* 8: 249-257.
- Amann, R.L., Ludwig, W. y Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Andersen, S., Christophersen, G. y Magnesen, T. (2011). Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster. *Can. J. Zool.* 89: 579-598.
- Arahal, D.R., Lekunberri, I., González, J.M., Pascual, J., Pujalte, M.J., Pedrós-Alió, C. y Pinhassi, J. (2007). *Neptuniibacter caesariensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine genome-sequenced gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1000-1006. doi:10.1099/ijs.0.64524-0.
- Aranda-Burgos, J.A., da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J. y Martínez-Patiño, D. (2014). Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- larvae. *Aquaculture* 420-421: 38-48. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.032
- Araya, R. A., Jorquera, M.A. y Riquelme, C.E. (1999). Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 72: 261-271.
- Arzul, I., Nicolas, J.-L., Davison, A.J. y Renault, T. (2001). French scallops: A new host for ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290: 342-349. doi:10.1006/viro.2001.1186.
- Arzul, I., Corbeil, S., Morga, B. y Renault, T. (2017). Viruses infecting marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2017.01.009.
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R. y Nicolas, J.-L. (2016). Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 464: 434-444. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.07.020.
- Attramadal, K.J.K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O. y Olsen, Y. (2012a). Recirculation as a microbial control strategy in intensive aquaculture of marine larvae. *Aquacult. Eng.* 46: 27-39.
- Attramadal, K.J.K., Øie, G., Størseth, T.R., Alver, M.O., Vadstein, O. y Olsen, Y. (2012b). The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture* 330-333: 121-129.
- Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.-P. y Göker, M. (2010a). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genomic Sci.* 2: 117-134. doi: 10.4056/sigs.531120.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auch, A.F., Klenk, H.-P. y Göker, M. (2010b). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand. Genomic. Sci.* 2: 142-148. doi:10.4056/sigs.541628.
- Auffret, M., Yergeau, É., Pilote, A., Proulx, É, Proulx, D., Greer, C.W., Vandenberg, G. y Villemur, R. (2013). Impact of water quality on the bacterial populations and off-flavours in recirculating aquaculture systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84: 235-247. doi:10.1111/1574-6941.12053.
- Austin, B. (2017). The value of cultures to modern microbiology. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* doi:10.1007/s10482-017-0840-8.
- Avendaño, R.E. y Riquelme, C.E. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquac. Res.* 30: 893-900.
- Avendaño-Herrera, R.E., Dekovic, M. y Riquelme, C.E. (2001). Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en cultivo masivo. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 36: 31-41.
- Azam, F. y Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 782-791.
- Azevedo, C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. *J. Parasitol.* 75: 627-635.
- Azevedo, C., Montes, J. y Corral, L. (1999). A revised description of *Haplosporidium armoricum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. *Parasitol. Res.* 85: 977-983.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baird, R.H. (1958). On the swimming behaviour of escallops (*Pecten maximus* L.). *Proc. Malacological Soc. Lond.* 33: 67-71.
- Balboa, S. (2012). Estudio de la variabilidad intraespecífica del patógeno de almeja *Vibrio tapetis*. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114: 173-186.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T. y Cunningham, D.P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol.* 96: 147-150.
- Barber, B.J. y Blake, N.J. (2006). Reproductive physiology. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 357-416.
- Barja, J.L., Lemos, M.L. y Toranzo, A.E. (1989). Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrob. Agents. Ch.* 33: 1674-1679.
- Baumann, P. y Baumann, L. (1981). The marine Gram-negative eubacteria; genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. En *The Prokaryotes*. Starr M. P., Stolp H., Trüper H. G., Balows A. y Schlegel H. G. (eds). Springer, Berlin. pp: 1302–1330.
- Beaz-Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., De Watcher, M., Thompson, F.L., Swings, J., De Vos, P. y Romalde, J.L. (2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Diversity of vibrios with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 215-222.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L. y Figueras, M.J. (2010a). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Env. Microbiol. Rep.* 2: 34-43. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x.
- Beaz-Hidalgo, R., Diéguez, A.L., Cleenwerck, I., Balboa, S., Doce, A., de Vos, P. y Romalde, J.L. (2010b). *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 311-315. doi:10.1016/j.syapm.2010.06.007.
- Beleneva, I.A., Zhukova, N.V. y Maslennikova, E.F. (2003). Comparative study of microbial communities from cultured and natural populations of the mussel *Mytilus trossulus* in Peter the Great Bay. *Microbiology* 72: 472-477.
- Ben Cheikh, Y., Travers, M.A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D. y Le Foll, F. (2016). First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Dev. Comp. Immunol.* 57: 107-119. doi:10.1016/j.dci.2015.12.014.
- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E.C. y Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture- Towards a sustainable industry. *Microb. Biotechnol.* 9: 576-584.
- Bergh, Ø. y Strand, Ø. (2001). Great scallop, *Pecten maximus*, research and culture in Norway: a review. *Aquacult. Int.* 9: 305-318.
- Bergheim, A., Drengstig, A., Ulgenes, Y. y Fivelstad, S. (2009). Production of Atlantic salmon smolts in Europe-Current

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- characteristics and future trends. *Aquacult. Eng.* 41: 46-52. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.04.004.
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., Roque d'Orbcastel, E. y Vadstein, O. (2013). Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacult. Eng.* 53: 30-39. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.009.
- Blanco-García, A. y Kamermans, P. (2015). Optimization of blue mussel (*Mytilus edulis*) seed culture using recirculation aquaculture systems. *Aquac. Res.* 46: 977-986.
- Boettcher, K.J., Barber, B.J. y Singer, J.T. (1999). Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an α -Proteobacterium in JOD-affected animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2534-2539.
- Boettcher, K.J., Geaghan, K.K., Maloy, A.P. y Barber, B.J. (2005). *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1531-1537. doi:10.1099/ijs.0.63620-0.
- Borrego, J.J., Luque, A., Castro, D., Santamaría, J.A. y Martínez-Manzanares, E. (1996). Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of Brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* 9: 125-136. doi:10.1051/alr:1996016.
- Bowman, J.P. (2007). Bioactive compound sybthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs.* 5: 220-241.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brand, A.R. (2006). Scallop Ecology: Distributions and behavior. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 651-744.
- Brbić, M., Piškorec, M., Vidulin, V., Kriško, A., Šmuc, T. y Supek, F. (2016). The landscape of microbial phenotypic traits and associated genes. *Nucleic Acids Res.* 44: 10074-10090. doi:10.1093/nar/gkw964.
- Brevik, Ø.J., Ottem, K.F., Kamaishi, T., Watanabe, K. y Nylund, A. (2011). *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 111: 1044-1056. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Borrero, F.J., Perkins, F.O., Rivara, G., Hillman, R.E., Elston, R.A. y Chang, J. (1992). Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 11: 31-347.
- Brown, C. (1973). The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 215-223.
- Brown, C. (1974). A pigment-producing Pseudomonad which discolors culture containers of embryos of a bivalve mollusk. *Chesapeake Sci.* 15: 17-21. doi:10.2307/1350954.
- Burreson, E.M. y Stokes, N.A. (2000). Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelson* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Aquat. Anim. Health.* 12: 1-8.
- Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Mazón-Suastegui, J.M., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. y González-Ocampo, H.A. (2011). Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia:Ostreidae). *Rev. Biol. Trop.* 59: 183-191.
- Cano, J. y García, T. (1985). Scallop fishery in the coast of Málaga, S.E. Spain 5th Pectinid Workshop, La Coruña, Spain. 6-10 Mayo, 1985. p 8.
- Carella, F., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Furones, D. y De Vico, G. (2013). Nocardiosis in Mediterranean bivalves: First detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and *Ostrea edulis* from the gulf of Naples (Italy). *J. Invertebr. Pathol.* 114: 324-328. doi:10.1016/j.jip.2013.10.001.
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K.B., Engelsma, M.Y., Lacuesta, B., Ramilo, A., Gairín, I. y Furones, M.D. (2012). *Bonamia exitosa* (Haplosporidia) observed infecting the european flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the spanish Mediterranean coast. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 307-313. doi:10.1016/j.jip.2012.03.015.
- Carrasco, N., Hine, P.M., Durfort, M., Andree, K.B., Malchus, N., Lacuesta, B., González, M., Roque, A., Rodgers, C. y Furones, M.D. (2013). *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 412-413: 223-230. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.027.
- Castro, D., Pujalte, M.J., López-Cortes, L., Garay, E. y Borrego, J.J. (2002). Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *J. Appl. Microbiol.* 93: 438-447.
- Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I. y Stabili, L. (2009). Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea-Italy). *Environ. Monit. Assess.* 149: 465-475. doi:10.1007/s10661-008-0223-8.
- Chattopadhyay, M.K. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J. Biosci.* 31: 157-165.
- Christophersen, G. y Strand, Ø. (2003). Effect of reduced salinity on the great scallop (*Pecten maximus*) spat at two rearing temperatures. *Aquaculture* 215: 79-92.
- Christophersen, G., Torkildsen, L. y van der Meeren, T. (2006). Effect of increased water recirculation rate on algal supply and post-larval performance of scallop (*Pecten maximus*) reared in a partial open and continuous feeding system. *Aquac. Eng.* 35: 271-282.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J. y Figueras, M.J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Env. Microbiol.* 10: 1635-1640. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x.
- Collado, L., Guarro, J. y Figueras, M.J. (2009a). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J. Food Prot.* 72: 1102-1106.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. y Figueras, M.J. (2009b). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1391-1396. doi:10.1099/ijs.0.003749-0.
- Colwell, R.R. y Liston, J. (1960). Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.* 8: 104-109.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Comely, C.A. (1972). Larval culture of the scallop *Pecten maximus* (L.). *Rapports et Procès-verbaux du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 34: 365-378.
- Cragg, S.M. (2006). Development, physiology, behavior and ecology of scallop larvae. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 45-122.
- Croft, M.T. Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J. y Smith, A.G. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438: 90-93.
- Culliney, J.L. (1974). Larval development of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol. Bull.* 147: 321-332.
- Cuña-Casabellas, M.A. (1991). Instalaciones en el criadero de moluscos. En *Unidades didácticas de acuicultura*. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (ed). Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, España.
- Cytryn, E., van Rijn, J., Schramm, A., Gieseke, A., de Beer, D. y Minz, D. (2005). Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system. *Appl. Environ. Microb.* 71: 6134-6141. doi:10.1128/AEM.71.10.6134-6141.2005.
- D'Alvise, P.W., Lillebø, S., Prol-García, M.J., Wergeland, H.I., Nielsen, K.F., Bergh, Ø y Gram, L. (2012). *Phaeobacter gallaeciensis* reduces *Vibrio anguillarum* in cultures of microalgae and rotifers, and prevents vibriosis in cod larvae. *PLoS ONE* 7(8): e43996. doi:10.1371/journal.pone.0043996

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Davidson, J., Good, C., Welsh, C. y Summerfelt, S.T. (2011). Abnormal swimming behavior and increased deformities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 45: 109-117.
- De, B.C., Meena, D.K., Behera, B.K., Das, P., Das Mohapatra, P.K. y Sharma, A.P. (2014). Probiotics in fish and shellfish cultura: inmunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol. Biochem.* 40: 921-971.
- Delgado, M., Carrasco, N., Elandaloussi, L., Furones, D. y Roque, A. (2007). A mortality event of the venerid bivalve *Callista chione* (Linnaeus, 1758) in a hatchery system- A case study. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 27: 214-222.
- Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C. y Fleury, Y. (2014). Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: Haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol. Lett.* 350: 107-116. doi:10.1111/1574-6968.12308.
- Devauchelle, N. y Mingant, C. (1991). Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.* 4: 41-51.
- Di Salvo, L.H., Blecka, J. y Zebal, R. (1978). *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 219-221.
- Directiva del Consejo Europeo. Directiva nº 98/83/CE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 3 de noviembre de 1998.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dobretsov, S., Dahms, H-U y Qian, P-Y. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22: 43-54.
- Dopazo, C.P., Lemos, M.L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 97-101.
- Douillet, P. y Langdon, C.J. (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biol. Bull.* 184: 36-51.
- Douillet, P. y Langdon, C.J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25-40.
- Dubert, J., Nelson, D.R., Spinard, E.J., Kessner, L., Gómez-Chiarri, M., Da Costa, F., Prado, S. y Barja, J.L. (2016a). Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. *J. Invertebr. Pathol.* 133: 27-33. doi:10.1016/j.jip.2015.11.008.
- Dubert, J., Romalde, J.L., Prado, S. y Barja, J.L. (2016b). *Vibrio bivalvicida* sp. nov., a novel larval pathogen for bivalve molluscs reared in a hatchery. *Syst. Appl. Microbiol.* 39: 8-13. doi:10.1016/j.syapm.2015.10.006.
- Dubert, J., Romalde, J.L., Spinard, E.J., Nelson, D.R., Gómez-Chiarri, M. y Barja, J.L. (2016c). Reclassification of the larval pathogen for marine bivalves *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus* as *Vibrio*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- europaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 4791-4796. doi:10.1099/ijsem.0.001431.
- Dubert, J., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (2017). New insights into pathogenic Vibrios affecting bivalves hatcheries: Present and future prospects. *Front. Microbiol.* 8: 762. doi:10.3389/fmicb.2017.00762.
- Duncan, P.F., Brand, A.R., Strand, Ø. y Foucher, E. (2016). The European scallop fisheries for *Pecten maximus*, *Aequipecten opercularis*, *Chlamys islandica* and *Mimachlamys varia*. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 781-858.
- Elston, R.A. y Leibovitz, L. (1980). Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 964-978.
- Elston, R.A., Beattie, J.H., Friedman, C., Hedrick, R. y Kent, M.L. (1987). Pathology and significance of fatal inflammatory bacteremia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Fish Dis.* 10: 121-132.
- Elston, R.A., Humphrey, K., Gee, A., Cheney, D. y Davis, J. (2004). Progress in the development of effective probiotic bacteria for bivalve shellfish hatcheries and nurseries. *J. Shellfish. Res. (Abstracts)* 23: 654.
- Encomendero, L. y Dupré, E. (2003). Efecto del sustrato en la intensidad del asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819 (*Bivalvia*, *Pectenidae*) en ambiente controlado. *Invest. Mar. Valparaíso*, 31: 25-32. doi:10.4067/S0717-71782003000100004.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Engelsma, M.Y., Roozenburg, I. y Joly, J.-P. (2008). First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. *Dis. Aquat. Organ.* 80: 229-234. doi:10.3354/dao01938.
- Erard-Le Denn, E., Morlaix, M., Dao, J.C. (1990). Effects of *Gyrodinium* cf. *aureolum* on *Pecten maximus* (post larvae, juveniles and adults). Proceeding of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund (Sweden). 26-30 June, 1989, pp: 132-136.
- Espeland, E.M., Francoeur, S.N. y Wetzel, R.G. (2001). Influence of algal photosynthesis on biofilm bacterial production and associated glucosidase and xylosidase activities. *Microb. Ecol.* 42: 524-530. doi:10.1007/s00248-001-1022-8.
- FAO (2008). Glossary of Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- FAO (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and Challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO-FIGIS (2017). Fisheries Global Information System (FIGIS). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Institutional websites
- Fernández-Álvarez, I. (1991). Reproducción y acondicionamiento de bivalvos en el criadero. En *Unidades didácticas de acuicultura*. Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura (ed), Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, España.
- Fernández-Zenoff, V., Siñeriz, F. y Farías, M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacterial

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- isolated from high-altitude aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7857-7863. doi:10.1128/AEM.01333-06.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L. y Martínez-Murcia, A. (2011). Recommendations for a new bacterial species description based on analysis of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull BISMis* 2: 1-16.
- Fournier, P.-E., Lagier, J.-C., Dubourg, G. y Raoult, D. (2015). Anaerobe from culturomics to taxonomogenomics: a need to change the taxonomy of prokaryotes in clinical microbiology. *Anaerobe* 36: 73-78. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.011.
- Friedman, C.S., Beattie, J.H., Elston, R. y Hedrick, R.P. (1991). Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94: 1-15. doi:10.1016/0044-8486(91)90124-P.
- Friedman, C.S., Beaman, B.L., Jongsik, C., Go, M., Gee, A. y Hedrick, R.P. (1998). *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 237-246.
- Frommlet, J., Guimarães, B., Sousa, L., Serôdio, J. y Alves, A. (2015). *Neptunomonas phycophila* sp. nov., isolated from a culture of *Symbiodinium* sp., a dinoflagellate symbiont of the sea anemone *Aiptasia tagetes*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 915-919. doi:10.1099/ijss.0.000039.
- Garland, C.D., Nash, G.V., Sumner, C.E. y McMeekin, T.A. (1983). Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tasmanian hatchery. *Aus. J. Mar. Fresh. Res.* 34: 483-487. doi:10.1071/MF9830483.
- Garnier, M., Labreuche, Y., García, C., Robert, M. y Nicolas, J.-L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial. Ecol.* 53: 187-196. doi:10.1007/s00248-006-9061-9.
- Gay, M., Berthe, F.C.J. y Le Roux, F. (2004a). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* 59: 49-56. doi:10.3354/dao059049.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.M. y Le Roux, F. (2004b). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 65-74. doi:10.3354/dao062065.
- Genard, B., Larouche, O., Nicolas, J.-L., Miner, P., Beaudin, M.-L. y Tremblay, R. (2014). Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*. *Aquat. Living. Resour.* 27: 27-34. doi: 10.1051/alr/2014005.
- Gibson, L.F., Woodworth, J. y George, A.M. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169: 111-120. doi:10.1016/S0044-8486(98)00369-X.
- Giovannoni, S.J. y Stingl, U. (2007). The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 820-826. doi:10.1038/nrmicro1752.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Godoy, F.A., Espinoza, M., Wittwer, G., Uriarte, I. y Aranda, C. (2011). Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Cienc. Mar.* 37: 339-348. doi:10.7773/cm.v37i3.1882.
- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Turnbull, J.F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270. doi:10.1016/S0044-8486(00)00431-2.
- Gómez-León, J. , Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B. y Figueras, A. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured Carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 98-104. doi:10.1128/AEM.71.1.98.
- Granados-Amores, A., Campa-Córdova, A.I., Araya, R., Mazón, Suastegui, J.M. y Saucedo, P.E. (2012). Growth, survival and enzyme activity of lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) spat treated with probiotics at the hatchery. *Aquac. Res.* 43: 1335-1343. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02937.x.
- Green, B.D. y Keller, M. (2006). Capturing the uncultivated majority. *Curr. Opin. Microbiol.* 17: 236-240. doi:10.1016/j.copbio.2006.05.004.
- Green, T., Raftos, D., O'Connor, W., Adlard, R.D. y Barnes, A.C. (2011). Disease prevention strategies for QX disease (*Marteilia sydneyi*) of Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *J. Shellfish. Res.* 30: 47-53. doi:10.2983/035.030.0108.
- Grover, J.P. (2000). Resource competition and community structure in aquatic microorganisms: experimental studies of algae and

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- bacteria along a gradient of organic carbon to inorganic phosphorous supply. *J. Plankton Res.* 22: 1591-1610. doi:10.1093/plankt/22.8.1591.
- Gruffydd, L.D. y Beaumont, A.R. (1972). A method of rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. *Mar. Biol.* 15: 350-355.
- Guillard, R.R.L. (1959). Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull.* 117: 258-266.
- Harboe, T., Tuene, S., Mangor-Jensen, A., Rabben, H. y Huse, I. (1994). Design and operation of an incubator for yolk-sac larvae of Atlantic halibut. *Prog. Fish. Cult.* 56: 188-193.
- Harris, J.M. (1993). The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* 25: 195-231.
- Harshbarger, J.C., Chang, S.C. y Otto, S.V. (1977). *Chlamydiae* (with phages), *Mycoplasmas* and *Rickettsiae* in Chesapeake Bay bivalves. *Science* 196: 666-668.
- Heidelberg, K.B., Gilbert, J.A. y Joint, I. (2010). Marine genomics: at the interface of marine microbial ecology and biodiscovery. *Microb. Biotechnol.* 3: 531-543. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00193.x.
- Helm, M.M. y Bourne, N. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. *Documento técnico de pesca*, 471. Lovatelli, A. (ed). FAO, Roma, Italia.
- Hess-Erga, O.-K., Attramadal, K.J.K. y Vadstein, O. (2008). Biotic and abiotic particles protect marine heterotrophic bacteria during UV and ozone disinfection. *Aquat. Biol.* 4: 147-154. doi:10.3354/ab00105.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hess-Erga, O.-K., Blomvågnes-Bakke, B. y Vadstein, O. (2010). Recolonization by heterotrophic bacteria after UV irradiation or ozonation of seawater; a simulation of ballast water treatment. *Water Res.* 44: 5439-5449. doi:10.1016/j.watres.2010.06.059.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F. y Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* 40: 3-22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030.
- Hine, P.M. y Wesney, B. (1997). Virus-like particles associated with cytopathology in the digestive gland epithelium of scallops *Pecten novaezelandiae* and toheroa *Paphies ventricosum*. *Dis. Aquat. Organ.* 29: 197-204. doi: 10.3354/dao029197
- Hine, P.M. y Diggles, B.K. (2002). Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis. Aquat. Organ.* 50: 137-144. doi:10.3354/dao050137
- Hodgson, C.A. y Burke, R.D. (1988). Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*. *Biol. Bull.* 174: 303-318.
- Holmström, C. y Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 285-293. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x.
- Holmström, C., Rittschof, D. y Kjelleberg, S. (1992). Inhibition of settlement by larvae of *Balanus Amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2111-2115.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. y Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41: 47-58. doi:10.1016/S0168-6496(02)00239-8.
- Hsu, T.-T.D. y Lee, J. (2015). Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water. *Zoonoses Public Hlth.* 62: 579-589. doi:10.1111/zph.12215.
- Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Yoshikawa, S., Christen, R. y Mikhailov, V.V. (2002). *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 235-240.
- Jasmin, M.Y., Wagaman, H., Yin, T.A., Ina-Salwany, M.Y., Daud, H.M. y Karim, M. (2016). Screening and evaluation of local bacteria isolated from shellfish as potential probiotics against pathogenic *Vibrios*. *J. Environ. Biol.* 37: 801-809.
- Jiang, H.F., Liu, X.-L., Chang, Y.-Q., Liu, M.-T. y Wang, G.-X. (2013). Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish. Shellfish. Immun.* 35: 86-91. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.009.
- Joint, I., Mühling, M. y Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria- an essential prerequisite for biodiscovery. *Microb. Biotechnol.* 3: 564-575. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x.
- Jorquera, M.A., Riquelme, C.E., Loyola, L.A. y Muñoz, L.F. (1999). Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- from cultures of scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquac. Int.* 7: 433-448. doi:10.1023/A:1009246007208.
- Jorquera, M.A., Silva, F.R. y Riquelme, C.E. (2001). Bacteria in the cultura of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquacult. Int.* 9: 285-303. doi:10.1023/A:1020449324456.
- Joux, F., Jeffrey, W.H., Lebaron, P. y Mitchell, D.L. (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3820-3827.
- Kamaishi, T., Miwa, S., Goto, E., Matsuyama, T. y Oseko, N. (2010). Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. *Dis. Aquat. Organ.* 89: 145-154. doi:10.3354/dao02188.
- Kamermans, P., Blanco, A., Joaquim, S., Matias, D., Magnesen, T., Nicolas, J.-L., Petton, B. y Robert, R. (2016). Recirculatory nursery systems for bivalves. *Aquacult. Int.* 24: 827-842.
- Kanehisa, M., Sato, Y. y Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428: 726-731. doi:10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Kapareiko, D., Lim, H.J., Schott, E.J., Hanif, A. y Wikfors, G.H. (2011). Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: II. Isolation and screening for bioactivity. *J. Shellfish. Res.* 30: 617-625. doi:10.2983/035.030.0304.
- Karunasagar, I., Otta, S.K. y Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140: 241-245. doi:10.1016/0044-8486(95)01180-3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kesarcodi- Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2009a). Challenge of New Zeland Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* larvae using two *Vibrio* pathogens: a hatchery study. *Dis. Aquat. Organ.* 86: 15-20. doi:10.3354/dao02100.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2009b). Screening for probiotics of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. *Aquaculture* 296: 159-164. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.08.008.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2010). *Alteromonas macleodii* 0444 and *Neptunomonas* sp. 0536, two novel probiotics for hatchery-reared Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*. *Aquaculture* 309: 49-55. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.09.019.
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L. y Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344-349: 29-34. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.02.029.
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., Asmani, K. y Robert, R. (2016). Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. *Aquac. Res.* 47: 1221-1230. doi:10.1111/are.12579.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- King, R.K., Flick, G.J.Jr., Pierson, M.D., Smith, S.A., Boardman, G.D. y Coale, C.W.Jr. (2004). Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems. *J. Aquat. Food Prod. T.* 13: 125-133. doi:10.1300/J030v13n01.
- Koeppel, A., Perry, E.B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D.M., Rooney, A.P., Brambilla, E., Connor, N., Ratcliff, R.M., Nevo, E. y Cohan, F.M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2504-2509. doi:10.1073/pnas.0712205105.
- Kokou, F., Makridis, P. Kentouri, M. y Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquac. Res.* 43: 1520-1527. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. y Tiedje, J.M. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. trans. R. Soc. B.* 361: 1929-1940. doi:10.1098/rstb.2006.1920.
- Krejčík, Z., Denger, K., Weinitschke, S., Hollemeyer, K., Pačes, V., Cook, A.M. y Smits, T.H.M. (2008). Sulfoacetate released during the assimilation of taurine.nitrogen by *Neptuniibacter caesariensis*: Purification of sulfoacetaldehyde dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 190: 159-168. doi:10.1007/s00203-008-0386-2.
- Kristmundsson, A., Helgason, S., Bambir, S.H., Eydal, M. y Freeman, M.A. (2011). Previously unknown apicomplexan species infecting Iceland scallop, *Chlamys islandica* (Müller, 1776), queen scallop, *Aequipecten opercularis* L., and king scallop, *Pecten maximus* L. *J. Invertebr. Pathol.* 108: 147-155. doi:10.1016/j.jip.2011.08.003.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kueh, C.S.W. y Chan, K.-Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 41-47.
- Lambert, C., Nicolas, J.-L., Cilia, V. y Corre, S. (1998). *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 481-487.
- Lane, H.S., Webb, S.C. y Duncan, J. (2016). *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Dis. Aquat. Organ.* 118: 55-63. doi:10.3354/dao02960.
- Lasa, A., Mira, A., Camelo-Castillo, A., Belda-Ferre, P. y Romalde, J.L. (2016). Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-pyrosequencing. *Int. Microbiol.* 19: 93-99. doi:10.2436/20.1501.01.267.
- Lau, S.C.K., Thiagarajan, V., Cheung, S.C.K. y Qian, P.-Y. (2005). Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquat. Microb. Ecol.* 38: 41-51. doi:10.3354/ame038041.
- Le Gall, G. y Mialhe, E. (1992). Purification of Rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. *Dis. Aquat. Organ.* 12: 215-220. doi:10.3354/dao012215
- Le Gall, G., Chagot, D., Mialhe, E. y Grizel, H. (1988). Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Organ.* 4: 229-232. doi:10.3354/dao004229.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Le Gall, G., Mialhe, E., Chagot, D. y Grizel, H. (1991). Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jaques scallop *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Organ.* 10: 139-145. doi: 10.3354/dao010139
- Le Pennec, M., Paugam, A. y Le Pennec, G. (2003). The pelagic life of the pectinid *Pecten maximus*- A review. *ICES J. Mar. Sci.* 60: 211-223.
- Léger, L. y Duboscq, O. (1917). *Pseudoklossia pectinis* n. sp. et l'origine des adéleïdées. *Arch. Zool. Exp. Gén. (Suppl Notes Rev)* 68: 88–94.
- Leibovitz, L. (1989). Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Fish Dis.* 12: 125-136. doi:10.1111/j.1365-2761.1989.tb00284.x.
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y. y Le Roux, F. (2014). Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogens in naturally infected oysters. *ISME J.* 9: 1523-1531. doi:10.1038/ismej.2014.233.
- Lester, R.J.G. y Davis, G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 181-187.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A.L., Romalde, J.L. y Figueras, M.J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 133-138.
- Levican, A., Collado, L. y Figueras, M.J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- food and sewage. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 22-27. doi:10.1016/j.syapm.2012.11.003.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L. y Figueras, M.J. (2015). *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Syst. Appl. Microbiol.* 38: 30-35. doi:10.1016/j.syapm.2014.10.011.
- Leyton, Y.E. y Riquelme, C.E. (2008). Use of specific bacterial-microalgal biofilms for improving the larval settlement of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) on three types of artificial spat-collecting materials. *Aquaculture* 276: 78-82. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.01.037.
- Li, H., Lin, W., Zhang, G., Cai, Z., Cai, G., Chang, Y. y Xing, K. (2006). Enhancement of larval settlement and metamorphosis through biological and chemical cues in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Aquaculture* 258: 416-423. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.013.
- Liltved, H. y Cripps, S.J. (1999). Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquac. Res.* 30: 445-450. doi:10.1046/j.1365-2109.1999.00349.x.
- Lim, H.J., Kapareiko, D., Schott, E.J., Hanif, A. y Wikfors, G.H. (2011). Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: I. Isolation and screening for bioactivity. *J. Shellfish. Res.* 30: 609-615. doi:10.2983/035.030.0303.
- Liu, R., Qiu, L., Yu, Z., Zi, J., Yue, F., Wang, L., Zhang, H., Teng, W., Liu, X. y Song, L. (2013). Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *J. Invertebr. Pathol.* 114: 144-150. doi:10.1016/j.jip.2013.07.005.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. y Toranzo, A.E. (1987). Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*, 65: 15-29.
- Lodeiros, C., Freitas, L., Fernández, E., Vélez, A. y Bastardo, J. (1989). Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente* 28: 165-169.
- Lodeiros, C., Freitas, L. y Vélez, A. (1992). Bacillary necrosis in larvae of the bivalve *Euvola ziczac* (Linnaeus, 1758) caused by a *Pseudomonas* sp. *Acta Científica Venezolana* 43: 154-158.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F. y Wegner, K.M. (2016). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environ. Microbiol.* 18: 970-987. doi:10.1111/1462-2920.13163.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas, J.-L. y Guyot, M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar. Biotechnol.* 6: 633-641. doi:10.1007/s10126-004-3009-1.
- Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F. y Campa-Córdova, A.I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321: 136-144.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Macey, B.M. y Coney, V.E. (2005). Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245: 249-261. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.11.031.
- Macey, B.M. y Coney, V.E. (2006). Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Mar. Biotechnol.* 8: 246-259. doi:10.1007/s10126-005-0113-9.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1994). Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 180-186.
- Magnesen, T., Bergh, Ø. y Christiphersen, G. (2006). Yields of great scallop, *Pecten maximus*, larvae in a commercial flow flow-through rearing system in Norway. *Aquacult. Int.* 14: 377-394. doi:10.1007/s10499-005-9039-5
- Magnesen, T., Jacobsen, A. y Moepi, M.H. (2013). Effect of different filter methods on seawater quality at a marine scallop hatchery. *J. Aquac. Res. Development* 4:168. doi: 10.4172/2155-9546.1000168
- Maki, J.S., Rittschof, D. y Mitchell, R. (1992). Inhibition of larval barnacle attachment to bacterial films: an investigation of physical properties. *Microb. Ecol.* 23: 97-106. doi: 10.1007/BF00165910
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O. y Dinis, M.T. (2005). Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- approach. *Lett. Appl. Microbiol* 40: 274-277. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01676.x
- Makridis, P., Costa, R.A. y Dinis, M.T. (2006). Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture* 255: 76-81. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.010
- Makridis, P., Ferreira, T., Kokou, F., Tsigenopoulos, C.S. y Divanach, P. (2012). Quantitative and qualitative aspects of bacterial communities associated with cultures of *Chlorella minutissima*. *J. World Aquacult. Soc.* 43: 571-578. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00585.x
- Maloy, A.P., Ford, S.E., Karney, R.C. y Boettcher, K.J. (2007). *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 269: 71-83. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.008.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukal, R., Simon, M., Tindall, B.J. y Brinkhoff, T. (2006). Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisengeria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1293-1304. doi:10.1099/ijs.0.63724-0.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mason, J. (1983). Scallop and Queen Fisheries in the British Isles. En *Fishing News Books Ltd* (Buckland Foundation), Farnham, UK. pp: 144.
- Medellin-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S. y Griffiths, M.W. (2007). Probiotic effects virulence related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4259-4267. doi: 10.1128/AEM.00159-07.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P. y Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:6, 1-14. doi: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Merino, G., Uribe, E., Soria, G. y von Brand, E. (2009). A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculation culture systems. *Aquacult. Eng.* 40: 95-103. doi:10.1016/j.aquaeng.2008.11.002.
- Meyer, G.R., Lowe, G.J., Gilmore, S.R. y Bower, S.M. (2017). Disease and mortality among Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* putatively caused by infection with *Francisella halioticida*. *Dis. Aquat. Organ.* 125: 79-84. doi:10.3354/dao03130
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V. y Blancheton, J.P. (2009). Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1935-1946. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04378.x
- Minchin, D. (1985). Possible effects of an intense algal bloom of *Gyrodinium aureolum* on a year class of scallops (*Pecten*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- maximus*). 5th Pectinid Workshop, La Coruña, Spain. 6-10 Mayo, 1985. p 14.
- Minchin, D. (1993). Gigantism in the scallop, *Pecten maximus*, (L.). En Aldrich, J.C. (Ed.), 27th European Marine Biology Symposium, 1992. Japaga press, Wicklow, Ireland. pp: 163-168.
- Moal, J., Samain, J.F., Corre, S., Nicolas, J.-L. y Glynn, A. (1996). Bacterial nutrition of great scallop larvae. *Aquacult. Int.* 4: 215-223. doi:10.1007/BF00117383.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C. y Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* 35: 182-185. doi:10.1093/nar/gkm321.
- Morrison, C. y Shum, G. (1982). *Chlamydia*-like organisms in the digestive diverticula of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk). *J. Fish Dis.* 5: 173-184. doi:10.1111/j.1365-2761.1982.tb00472.x.
- Morrison, C. y Shum, G. (1983). Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Fish Dis.* 6: 537-541. doi:10.1111/j.1365-2761.1983.tb00108.x.
- Mortensen, S.H., Hjeltne, B., Rødseth, O., Krogsrud, J. y Christie, K.E. (1990). Infectious Pancreatic Necrosis Virus, serotype N1, isolated from Norwegian halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and scallops (*Pecten maximus*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 10: 42-43.
- Mortensen, S.H., Bachere, E., Le Gall, G. y Mialhe, E. (1992). Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Organ.* 12: 221-227.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mottola, A., Bonerba, E., Figueras, M.J., Pérez-Cataluña, A., Marchetti, P., Serraino, A., Bozzo, G., Terio, V., Tantillo, G. y Di Pinto, A. (2016a). Occurrence of potentially pathogenic arcobacters in shellfish. *Food Microbiol.* 57: 23-27. doi:10.1016/j.fm.2015.12.010.
- Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Cekano, G.V., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M.J. y Di Pinto, A. (2016b). Occurrence of emerging food-borne pathogenic *Arcobacter* spp. isolated from precut (ready-to-eat) vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 236: 33-37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.012.
- Murchelano, R.A. y Brown, C. (1968). Bacteriological study of the natural flora of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 519-520. doi:10.1016/0022-2011(68)90206-1.
- Murchelano, R.A. y Bishop, J. (1969). Bacteriological study of laboratory-reared juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 14: 321-327. doi:10.1016/0022-2011(69)90158-X.
- Nagashima, H., Zulkharnain, A.B., Maeda, R., Fuse, H., Iwata, K. y Omori, T. (2010). Cloning and nucleotide sequences of carbazole degradation genes from marine bacterium *Neptuniibacter* sp. strain CAR-SF. *Curr. Microbiol.* 61: 50-56. doi:10.1007/s00284-009-9575-8.
- Nakamura, A., Takahashi, K.G. y Mori, K. (1999). Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: potentially as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish. Pathol.* 34: 139-144. doi:10.3147/jsfp.34.139.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Narvarte, M.A. y Pascual, M.S. (2001). Diet trials on tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* (d'Orb) larvae. *Aquacult. Int.* 9: 127-131.
- Natrah, F.M.I., Defoirdt, T., Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2011). Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 13: 109-126.
- Natrah, F.M.I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F.Md. y Defoirdt, T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Rev. Aquacult.* 6: 48-61.
- Nicolas, J.-L., Robic, E. y Ansquer, D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83: 237-248.
- Nicolas, J.-L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. y Ansquer, D. (1996). Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Organ.* 27:67-76.
- Nicolas, J.-L., Corre, S. y Cochard, J.-C. (2004). Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microb. Ecol.* 48: 400-413.
- Nimrat, S., Boonthai, T. y Vuthiphandchai, V. (2011). Effects of probiotics forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 169: 244-258.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T. y Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.* 159: 443-450.
- Nylund, A., Ottem, K.F., Watanabe, K., Karlsbakk, E. y Krossøy, B. (2006). *Francisella* sp. (Family *Francisellaceae*) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch. Microbiol.* 185: 383-392. doi:10.1007/s00203-006-0109-5.
- Ottaviani, D., Chierichetti, S., Rocchegiani, E., Bartolini, C., Masini, L., Santarelli, S. y Leoni, F. (2013). Bioaccumulation experiments in mussels contaminated with the food-borne pathogen *Arcobacter butzleri*: preliminary data for risk assessment. *Biomed Res. Int.* Article ID 153419: 1-5. doi:10.1155/2013/153419.
- Oyston, P.C.F. (2008). *Francisella tularensis* : unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J. Med. Microbiol.* 57: 921-930. doi:10.1099/jmm.0.2008/000653-0.
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A.G., Willassen, E., Bergh, Ø., Bovo, C., Skår, C. y Mortensen, S. (2008). *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Dis. Aquat. Organ.* 81: 153-161. doi:10.3354/dao01950.
- Park, S., Park, J.-M., Kang, C.-H. y Yoon, J.-H. (2015). *Aliiroseovarius pelagivivens* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater and reclassification of three species of the genus *Roseovarius* as *Aliiroseovarius crassostreae* comb. nov., *Aliiroseovarius halocynthiae* comb. nov. and *Aliiroseovarius sediminilitoris* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 2646-2652. doi:10.1099/ijss.0.000315.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Paulet, Y.M., Lucas, A. y Gérard, A. (1988). Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* L. from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119: 145-156.
- Paulet, Y.M., Bekhadra, F., Devauchelle, N., Donval, A. y Dorange, G. (1997). Cycles saisonniers, reproduction et qualité des ovocytes chez *Pecten maximus* en rade de Brest. *Annales de l'Institut Océanographique*, Paris, 73 (1): 101-112.
- Pfeiffer, T.J. y Rusch, K.A. (2000). An integrated system for microalgal and nursery seed clam culture. *Aquac. Eng.* 24: 15-31.
- Pinhassi, J. y Berman, T. (2003). Differential growth response of colony-forming α - and γ - Proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 199-211. doi:10.1128/AEM.69.1.199.
- Prado, S. (2006). Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis y probiosis. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J. y Barja, J.L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Organ.* 67: 209-215. doi:10.3354/dao067209.
- Prado, S., Romalde, J.L. y Barja, J.L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet. Microbiol.* 145: 187-197.
- Prado, S., Dubert, J., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (2014). *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 1641-1646. doi:10.1099/ijs.0.051417-0.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Prol-García, M.J. y Pintado, J. (2013). Effectiveness of probiotic *Phaeobacter* bacteria grown in biofilters against *Vibrio anguillarum* infections in the rearing of turbot (*Psetta maxima*) larvae. *Mar. Biotechnol.* 15: 726-738. doi:10.1007/s10126-013-9521-4.
- Pujalte, M.J., Ortigosa, M., Macián, M.C. y Garay, E. (1999). Aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int. Microbiol.* 2: 259-266.
- Qian, P.-Y., Lau, S.C.K., Dahms, H.-U., Dobretsov, S. y Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 9: 399-410.
- Quigley, D.T.G. (2015). Biodiversity of the Order Pectinoidea (Mollusca: Bivalvia) in Irish waters. Book of Abstracts, 20th International pectinid Workshop, Galway, Ireland. 22-28 April, 2015. pp: 141-142.
- Ray, S.M. (1996). Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 15: 9-11.
- Reglamento (CE) N° 1430/90 de la Comisión de 22 de junio de 1994 por el que se modifican los Anexos I, II, III y IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial las Comunidades Europeas de n° L156/6 de 23/06/1994* p. 0006-0008.
- Renault, T. y Cochenec, N. (1994). Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the pacific oyster *Crassostrea*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 160-162. doi:10.1006/jipa.1994.1090
- Renault, T. y Novoa, B. (2004). Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living. Resour.* 17: 397-409. doi:10.1051/alr
- Renault, T., Chollet, B., Cochenne, N. y Gerard, A. (2002). Shell disease in Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, reared in France. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 1-6. doi:10.1016/S0022-2011(02)00009-5.
- Ribalet, F., Intertaglia, L., Lebaron, P. y Casotti, R. (2008). Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. *Aquat. Toxicol.* 86: 249-255.
- Richards, G.P., Watson, M.A., Needleman, D.S., Church, K.M. y Häse, C. (2015). Mortalities of Eastern and Pacific oyster larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 292-297. doi:10.1128/AEM.02930-14.
- Richter, M. y Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 19126-19131. doi:10.1073/pnas.0906412106.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D. y Villaescusa-Celaya, J.A. (1998). Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacult. Eng.* 19: 1-6.
- Riddle, R.R., Gibbs, P.R., Willson, R.C. y Benedik, M.J. (2003). Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 6-12. doi:10.1007/s10295-002-0005-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R.E. y Mayhew, T. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.* 41: 451-467.
- Riquelme, C.E., Chavez, P., Morales, Y. y Hayashida, G. (1994). Evidence of parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biol. Res.* 27: 129-134.
- Riquelme, C.E., Hayashida, G., Vergara, N., Vasquez, A., Morales, Y. y Chavez, P. (1995). Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138: 49-60.
- Riquelme, C.E., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Vergara, N. y Araya, R. (1996a). Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J. Invertebr. Pathol.* 67: 213-218.
- Riquelme, C.E., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. y Ishida, Y. (1996b). Isolation of a native bacterial strain of the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* 15: 369-374.
- Riquelme, C.E., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. y Candia, M. (1997). Potential probiotics strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- Riquelme, C.E., Araya, R. y Escribano, R. (2000). Selective incorporation of bacteria for *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Riquelme, C.E., Jorquera, M.A., Rojas, A.I., Avendaño, R.E. y Reyes, N. (2001). Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192: 111-119.
- Robert, R., Miner, P. y Nicolas, J.-L. (1996). Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquac. Int.* 4: 305-313. doi:10.1007/bf00120947.
- Rojas, R., Miranda, C.D. y Amaro, A.M. (2009). Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microb. Ecol.* 57: 129-139. doi:10.1007/s00248-008-9401-z.
- Rojas, R., Miranda, C.D., Opazo, R. y Romero, J. (2015). Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Invertebr. Pathol.* 124: 61-69. doi:10.1016/j.jip.2014.10.009.
- Romalde, J.L. y Barja, J.L. (2010). Bacteria in molluscs: good and bad guys. En *Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology. Microbiology Book Series Vol. 2*. Méndez-Vilas A. (ed). Formatex Research Center, Badajoz, Spain. pp: 136-147.
- Romalde, J.L., Diéguez, A.L., Doce, A., Lasa, A., Balboa, S., López, C. y Beaz-Hidalgo, R. (2013). Advances in the knowledge of the microbiota associated with clams from natural beds. En *Clam Fisheries and Aquaculture*. da Costa F. (ed). Nova Science Publishers: New York. pp: 163-190.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Romalde, J.L., Diéguez, A.L., Lasa, A. y Balboa, S. (2014). New *vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front. Microbiol.* 4. Article 413.
- Román, G. (1991). The European scallop fisheries for *Pecten maximus*, *Aequipecten opercularis*, *Chlamys islandica* and *Mimachlamys varia*. Spain. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 991-1058.
- Rosselló-Móra, R. y Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*25: 39-67.
- Rosselló-Móra, R. y Amann, R. (2015). Past and future specie definitions for *Bacteria* and *Archea*. *Syst. Appl. Microbiol.* 38: 209-216. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.001.
- Ruiz-Ponte, C., Cilia, V., Lambert, C. y Nicolas, J.-L. (1998). *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 537-542. doi:10.1099/00207713-48-2-537.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sánchez, J.L. y Nicolas, J.-L. (1999). The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar. Biotechnol.* 1: 52-59. doi:10.1007/PL00011751.
- Sainz-Hernández, J.C. y Maeda-Martínez, A.N. (2005). Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquac. Res.* 36: 1611-1618. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01386.x.
- Sakata, T., Yoshikawa, T. y Nishitarumizu, S. (2011). Algicidal activity and identification of an algicidal substance produced by marine

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pseudomonas* sp. C55a-2. *Fish. Sci.* 77: 397-402. doi:10.1007/s12562-011-0345-8.
- Salvesen, I., Skjermo, J. y Vadstein, O. (1999). Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K- strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture* 175: 337-350. doi:10.1016/S0044-8486(99)00110-6.
- Sandaa, R.-A., Magnesen, T., Torkildsen, L. y Bergh, Ø. (2003). Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 302-311. doi:10.1078/072320203322346164.
- Sandaa, R.-A., Brunvold, L., Magnesen, T. y Bergh, Ø. (2008). Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a Great scallop, *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture* 276: 14-21. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.007.
- Sandlund, N., Torkildsen, L., Magnesen, T., Mortensen, S. y Bergh, Ø. (2006). Immunohistochemistry of great scallop *Pecten maximus* larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Organ.* 69: 163-173. doi:10.3354/dao069163.
- Sastry, A.N. (1968). The relationships among food, temperature and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41: 44-53.
- Saulnier, D., de Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M. y García, C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial. Ecol.* 54: 787-798. doi:10.1007/s00248-009-9620-y.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Rohul Amin, A.K.M., Mino, S., Nakawaga, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F.L., Gómez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K. y Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4: 1-14. doi:10.3389/fmicb.2013.00414.
- Schleifer, K.H. (2009). Classification of bacteria and archaea: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 533-542. doi:10.1016/j.syapm.2009.09.002.
- Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K. (2010). Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr. Opin. Biotech.* 21: 318-325. doi:10.1016/j.copbio.2010.03.011.
- Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersall-Sheldrake, A.R. y Miller, K.M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture* 256: 50-73. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.008.
- Sharrer, M.J. y Summerfelt, S.T. (2007). Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquacult. Eng.* 37: 180-191. doi:10.1016/j.aquaeng.2007.05.001.
- Silva-Aciaries, F.R., Carvajal, P.O., Mejías, C.A. y Riquelme, C.E. (2011). Use of macroalgae supplemented with probiotics in the

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) cultura in Northern Chile. *Aquac. Res.* 42: 953-961. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02678.x.
- Skjermo, J. y Vadstein, O. (1999). Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343. doi:10.1016/S0044-8486(99)00096-4.
- Spring, S., Scheuner, C., Göker, M. y Klenk, H.-P. (2015). A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Front. Microbiol.* 6: 281. doi:10.3389/fmicb.2015.00281.
- Stewart, E.J. (2012). Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* 194: 4151-4160. doi:10.1128/JB.00345-12.
- Strand, Ø. y Nylund, A. (1991). The reproductive cycle of the scallop *Pecten maximus* (L.) from two populations in Western-Norway, 60N and 64N. En *An International Compendium of Scallop Biology and Culture*. Shumway S.E. y Sandifer, P.A. (eds). World Aquaculture Society, Baton Rouge, La. pp: 95-105.
- Strand, Ø. y Parsons, J. (2006). Scandinavia. En *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Shumway S.E. y Parsons G.J. (eds). Elsevier Science Publishers. pp: 1067-1091.
- Strand, Ø., Solberg, P.T., Andersen, K.K. y Magnesen, T. (1993). Salinity tolerance of juvenile scallops (*Pecten maximus*) at low temperature. *Aquaculture* 115: 169-179. doi:10.1016/0044-8486(93)90367-8.
- Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T. y Deguchi, Y. (1981). Bacterial flora of coastal bivalves. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 47: 655-661.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sugita, H., Nakamura, H. y Shimada, T. (2005). Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* 243: 403-409. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.028.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. y Muroga, K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 33: 111-118. doi:10.3354/dao033111.
- Summerfelt, S.T. (2003). Ozonation and UV irradiation- An introduction and examples of current applications. *Aquacult. Eng.* 28: 21-36. doi:10.1016/S0144-8609(02)00069-9.
- Sutton, D.C. y Garrik, R. (1993). Bacterial disease of cultures giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 16: 47-53. doi:10.3354/dao016047.
- Tal, Y., Watts, J.E.M. y Schreier, H.J. (2006). Anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2896-2904. doi:10.1128/AEM.72.4.2896-2904.2006.
- Tebble, N. (1966). British bivalve seashells. *British museum*, London. p: 212.
- ten Doeschate, K.I. y Coyne, V.E. (2008). Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284: 174-179. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.018.
- Timmons, M.B. y Ebeling, J.M. (2007). RAS. Recirculating Aquaculture. *NRCA Publication No 01-007*. Cayuga Aqua Ventures. New York.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Torkildsen, L. y Magnesen, T. (2004). Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*)- survival in different rearing systems. *Aquacult. Int.* 12: 489-507.
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Magnesen, T. y Bergh, Ø. (2005). Bacteria associated with early stages of the great scallop, *Pecten maximus*: Impact on larval survival. *Aquacult. Int.* 13: 575-592. doi:10.1007/s10499-005-9002-5.
- Trabal, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F. Morales-Bojórquez, E. y Romero, J. (2012). Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. *Microb. Ecol.* 64: 555-569. doi:10.1007/s00248-012-0039-5.
- Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F. y Romero, J. (2014). Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88: 69-83. doi:10.1111/1574-6941.12270.
- Travers, M.-A., Miller, K.B., Roque, A. y Friedman, C.S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131: 11-31. doi:10.1016/j.jip.2015.07.010.
- Travers, M.-A., Tourbiez, D., Parizadeh, L., Haffner, P., Kozic-Djellouli, A., Aboubaker, M., Koken, M., Dégremont, L. y Lupo, C. (2017). Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet. Res.* 48: 32. doi:10.1186/s13567-017-0438-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tubiash, H.S. y Otto, S.V. (1986). Bacterial problems in oysters. En: *Pathology in marine aquaculture*. Vivarès, C.P., Bonami, J.R. y Jasper, E. (eds). European Aquaculture Society, Spec. Publ., Bredene, Bélgica. pp: 233-242.
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E. y Leifson, E. (1965). Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90: 1036-1044.
- Tubiash, H.S., Colwell, R.R. y Sakazaki, R. (1970). Marine Vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 103: 271-272.
- Utting, S.D. y Millican, P.F. (1998). The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165: 167-178.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I. y Skjermo, J. (1993). A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. En: *Fish Farming Technology*. Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnereim, Ž.K. (eds). Balkema Publishers, Rotterdam, pp. 69–75.
- Vanderberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P. y Swings, J. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microb.* 65: 2592-2597.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000a). Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1139-1146.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000b). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 655-671.
- Villalba, A., Carballal, M.J., López, C., Cabada, A., Corral, L. y Azevedo, C. (1999). Branchial *Rickettsia*-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis. Aquat. Organ.* 36: 53-60. doi:10.3354/dao036053.
- Vynne, N.G., Månsson, M., Nielsen, K.F. y Gram, L. (2011). Bioactivity, chemical profiling, and 16S rRNA-based phylogeny of *Pseudoalteromonas* strains collected on a global research cruise. *Mar. Biotechnol.* 13:1062-1073. doi:10.1007/s10126-011-9369-4.
- Weimann, A., Mooren, K., Frank, J., Pope, P.B., Bremges, A. y McHardy, A.C. (2016). From genomes to phenotypes: Traitair, the microbial trait analyzer. *mSystem*. doi:10.1101/043315.
- Whitman, W.B. (2015). Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Syst. Appl. Microbiol.* 38: 217-222. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.003.
- Wiborg, K.F. y Bøhle, B. (1974). Occurrences of edible shellfish (bivalves) in Norwegian coastal waters (with a selection of marine gastropods). *Transl. Ser. Fish. Mar. Serv. Can.* No 2978 p: 34.
- Wu, Y., Clevenger, T. y Deng, B. (2005). Impacts of goethite particles on UV disinfection of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4140-4143. doi:10.1128/AEM.71.7.4140.
- Zewen, Z., Ting, X., Zhongyang, H., Xinzhong, W., Liuji, W., Qingguo, M. y Jiaqing, H. (2012). *Rickettsia*-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- in the Yueqing Bay in China. *Acta Oceanol. Sin.* 31: 106-115. doi:10.1007/s13131-012-0182-3.
- Zilber-Rosenberg, I. y Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 723-735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.
- Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K. y Lazado, C.L. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Vet. Quart.* 36: 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132
- Zurel, D., Benayahu, Y., Or, A., Kovacs, A. y Gophna, U. (2011). Composition and dynamics of the gill microbiota of an invasive Indo-Pacific oyster in the eastern Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 13: 1467-1476. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02448.x.